



**Cristina Andreia
Castro Correia**

**Espectroscopia de infravermelho na análise de
mostos e vinhos**



**Cristina Andreia
Castro Correia**

**Espectroscopia de infravermelho na análise de
mostos e vinhos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica do Doutor João A. B. P. Oliveira, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e com a co-orientação do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva

Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira

Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof^a. Elsa Cristina Dantas Ramalhosa

Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança

agradecimentos

À Dão Sul o acolhimento para a realização do estágio curricular, em particular ao Eng. Carlos Rodrigues e à Dra. Ana Rodrigues por toda a orientação e conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho.

Ao Doutor João Oliveira e ao Doutor Manuel António Coimbra pelo conhecimento científico que me transmitiram, dedicação, sugestões, ajuda e disponibilidade que me prestaram ao longo da realização da tese.

palavras-chave

Vinho, mosto, calibração de FTIR, fermentação

resumo

Este trabalho pretende a realização do controlo da fermentação dos mostos e controlo analítico de diversos parâmetros de mostos e vinhos, quer por métodos clássicos quer por espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).

A técnica de FTIR tem sido aplicado frequentemente como um método analítico, fornecendo resultados rápidos e satisfatórios no controlo de qualidade alimentar, particularmente em vinhos.

Neste trabalho foi feito o controlo periódico da calibração referente a vários parâmetros por análise de FTIR e foram efectuados ajustes nos modelos de calibração de espumantes e verificação das rectas de calibração de vinhos. Os parâmetros sujeitos a esta calibração/reavaliação foram o teor alcoólico, a acidez volátil, a acidez total, o pH e os açúcares redutores. O ajuste de calibração global desenvolvido para a análise de vinhos e espumantes permite bons resultados para os parâmetros teor alcoólico, acidez volátil e pH; tornando a metodologia de FTIR utilizável em análises de rotina.

Foram, ainda, realizados ensaios para a implementação de um método de análise de azoto facilmente assimilável pelas leveduras aquando da fermentação alcoólica em mostos, sendo este mais um parâmetro de caracterização química dos mostos.

keywords

Wine, must, FTIR calibration, fermentation

abstract

Classical methods and Fourier Transform medium Infrared (FTIR) spectroscopy were used to assess grape must fermentation and also the analytical control of several parameters of must and wine.

FTIR has often been used as an analytical method in food quality control, particularly in wines, providing reliable results.

In this work the periodic calibration of various parameters related with the analysis by FTIR were tested.

Adjustments were made in the existing model for calibration and verification of sparkling wine calibration functions. The parameters subjected to this calibration were the, total acidity, pH and reducing sugars. Global calibration adjustments developed for the analysis of still and sparkling wines allowed good results to the parameters of alcohol content, volatile acidity and pH; giving confidence to the FTIR method.

Tests were also conducted for the implementation of a method to analyze yeast assimilable nitrogen during the fermentation of must, which can end up as another chemical characterization factor of musts.

Índice

Contextualização.....	19
1. Introdução.....	20
1.1. Processo de obtenção do vinho.....	20
1.2. Composição química do vinho.....	21
1.2.1. Hidratos de carbono.....	21
1.2.2. Álcoois.....	21
1.2.3. Ácidos orgânicos	22
1.2.4. Constituição azotada.....	23
1.3. Controlo de qualidade do vinho e mosto	26
1.3.1. Análise de mosto e vinho	26
1.3.2. Espectroscopia de infravermelho.....	26
1.4. FTIR na análise de mostos e vinhos	28
1.4.1. O sistema Bacchus.....	29
1.5. Métodos clássicos	30
1.5.1. Açúcares redutores.....	30
1.5.2. Acidez Total	30
1.5.3. Acidez Volátil.....	31
1.5.4. pH	31
1.5.5. Massa Volúmica	31
1.5.6. Teor Alcoólico Volumétrico.....	32
1.5.7. Teor de dióxido de enxofre livre e total	32
1.6. Azoto facilmente assimilável	32
1.7. Validação de métodos.....	34
1.7.1. Gama de linearidade	34
1.7.2. Limite de detecção e quantificação.....	35
1.7.3. Precisão	36

1.7.4. Exactidão.....	37
1.7.5. Selectividade	37
1.7.6. Robustez.....	37
2. Objectivos.....	38
3. Materiais e Metodologias	39
3.1. Açúcares Redutores	39
3.2. Acidez Total.....	39
3.3. Acidez Volátil	39
3.4. pH.....	39
3.5. Título alcoométrico volúmico.....	40
3.6. Massa Volúmica.....	40
3.7. Controlo de maturação	40
3.8. Dióxido de enxofre livre e total	40
3.9. Azoto – Método de Sorensen.....	41
3.10. Equipamento WineScan Sistema Bacchus	41
3.11. Rectas de calibração.....	41
4. Resultados e Discussão.....	43
4.1. Análise de mostos e vinhos.....	43
4.1.1. Controlo de maturação e fermentação/vinificação.....	43
4.1.2. Controlo de vinhos em adega e engarrafados	46
4.2. Calibração do FTIR.....	56
5. Conclusão	67
6. Bibliografia.....	68
7. Anexos.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1: Álcoois mais importantes encontrados no vinho.	22
Tabela 2: Aminoácidos encontrados nos vinhos.	24
Tabela 3: Controlo de maturação das castas Encruzado, Touriga Nacional e Jaen.	43
Tabela 4: Análises efectuadas ao longo da fermentação dos mostos.	46
Tabela 5: Resultados do TAV obtidos por destilação comparados com FTIR.	47
Tabela 6: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação do TAV no Bacchus.	48
Tabela 7: Resultados de AV obtidos comparados com FTIR.	49
Tabela 8: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação do AV no Bacchus.	50
Tabela 9: Resultados de pH obtidos comparados com FTIR.	51
Tabela 10: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação do pH no Bacchus.	51
Tabela 11: Resultados de AT obtidos comparados com FTIR.	53
Tabela 12: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação de AT no Bacchus.	53
Tabela 13: Resultados de AR obtidos comparados com FTIR.	55
Tabela 14: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação de AR no Bacchus.	55
Tabela 15: Constituição dos produtos de calibração do Bacchus.	57
Tabela 16: Equações escolhidas e coeficientes de correlação dos espumantes bruto e meio-seco.	58
Tabela 17: Valores de FTIR e de métodos clássicos obtidos para dois espumantes bruto com as respectivas médias e desvios padrão.	61
Tabela 18: Valores de FTIR e de métodos clássicos obtidos para dois espumantes meio-seco com as respectivas médias e desvios padrão.	61
Tabela 19: Teste das médias emparelhadas aos resultados obtidos pela recta	61

de espumante bruto.

Tabela 20: Teste das médias emparelhadas aos resultados obtidos pela recta de espumante bruto. 62

Tabela 21: Resultados obtidos nas soluções de concentração conhecida feitas a partir de oxalato de amónio com o titulante a 0,1M. 63

Tabela 22: Resultados obtidos nas soluções de concentração conhecida feitas a partir de oxalato de amónio com o titulante a 0,05M. 64

Tabela 23: Resultados obtidos nas soluções de concentração conhecida feitas a partir de cloreto de amónio com o titulante a 0,05M. 64

Índice de Figuras

Figura 1: Representação da glucose, fructose, arabinose e xilose.	21
Figura 2: Estrutura dos ácidos orgânicos mais importantes encontrados nos vinhos.	22
Figura 3: Vibrações moleculares.	27
Figura 4: Equipamento de FTIR/UV-Vis e amostrador automático usado no laboratório.	29
Figura 5: Curva de crescimento das leveduras. A- Fase de, B- Fase de crescimento, C- Fase estacionária, D- Fase de morte.	33
Figura 6: Representação da evolução do teor alcoólico provável (A) e do pH (B) ao longo da maturação das castas Encruzado, Touriga Nacional e Jaen.	44
Figura 7: Representação da evolução da acidez total e da concentração de açúcares ao longo da maturação das castas Encruzado, Touriga Nacional e Jaen.	44
Figura 8: Controlo de vinificação de três mostos, descida da massa volúmica ao longo da fermentação.	45
Figura.9: Tabela de resultados fornecida pelo programa: Inst – valores instrumentais, Ref – valores de referência, Inst (*) – valores instrumentais depois da correcção, Dif – diferença entre os valores de referência e os instrumentais corrigidos.	59
Figura 10: Representação, fornecida pelo equipamento, da recta anterior TAV para espumante bruto e a nova implementada.	60
Figura 11: Resultados obtidos para o padrão cloreto de amónio com as respectivas barras de erro padrão.	65

Abreviaturas

AR – Açúcares reductores

AV – Acidez volátil

AT – Acidez total

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

MV – Massa volúmica

TAP – Teor alcoólico provável

TAV – Teor alcoólico volumétrico

Contextualização

O trabalho experimental foi desenvolvido no laboratório das instalações da Dão Sul, Sociedade Vitivinícola, sediado em Carregal do Sal. A Dão Sul, foi fundada em 1989, com o intuito de divulgar a nível nacional e internacional os vinhos do Dão. Depressa, este projecto se estendeu às principais regiões vitivinícolas portuguesas, como o Douro, Alentejo, Bairrada, Estremadura e, mais recentemente à região dos Vinhos Verdes. No Brasil também está representada, com o projecto ViniBrasil, situado no Vale de S. Francisco, produz vinhos únicos no Paralelo 8°.

A empresa engloba toda a produção de vinhos, desde a vinha, recepção, vinificação, armazenamento e engarrafamento. A sua aposta contínua é na qualidade dos seus produtos.

1. Introdução

O vinho é uma bebida alcoólica produzida pela fermentação de mosto de uva. Na União Europeia, o vinho é definido legalmente como um produto obtido exclusivamente pela fermentação total ou parcial de uvas frescas ou esmagadas ¹.

O vinho é proveniente de uma série de processos físico-químicos, que originam diversos compostos, condicionando assim as características organolépticas do produto final. É um substrato complexo, que possui etanol, ácidos orgânicos, glucose, fructose, glicerol, compostos fenólicos, proteínas e polissacarídeos como os constituintes base ². Os valores destes parâmetros estão fixados legalmente, uma vez que são facilmente passíveis de alteração. Assim, a produção de vinho necessita de controlo desde a chegada das uvas à adega até ao engarrafamento do produto final.

As opções de vinificação tomadas visam a transferência de qualidade das uvas para o vinho final. Assim, o potencial da uva é tido em consideração e a tecnologia é adaptada de forma a produzir o vinho pretendido.

1.1. Processo de obtenção do vinho

Existem numerosos processos de vinificação correspondentes aos diferentes tipos de vinho que se pretendem e que se distinguem pela forma de separação aplicada aos diferentes tecidos da uva.

O mosto de uvas é definido como o produto líquido obtido naturalmente ou por processos físicos a partir de uvas frescas. É admitido um título alcoométrico adquirido que não exceda 1% vol. O mosto pode depois ser inoculado com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, de uma determinada estirpe, que irão induzir a fermentação alcoólica de forma controlada ³. A fermentação alcoólica, consiste na transformação anaeróbia dos açúcares fermentescíveis em álcool, principalmente de glucose e fructose, com libertação de dióxido de carbono ⁴, representado pela equação:



A fermentação é um processo muito complexo, que engloba processos químicos, bioquímicos e físico-químicos, tornando possível a formação de vinho a partir do mosto.

O vinho pode ser produzido pelo método da bica aberta, normalmente utilizado para vinhos brancos e roses, onde a fermentação do mosto é feita sem maceração das partes sólidas do cacho ³. Para a produção de vinhos tintos, a fermentação ocorre na presença de massas, grainhas e películas, para conservar taninos das uvas e conferir cor.

O vinho espumante é obtido por uma segunda fermentação alcoólica do vinho, caracterizando-se por uma sobrepressão em garrafa, devida ao anidrido carbónico em solução, igual ou superior a 3 bar ⁴.

No Anexo I, encontra-se um diagrama geral de vinificação para vinho branco, rosé, tinto e espumante pelo método clássico.

1.2. Composição química do vinho

Os vinhos são de grande complexidade química, formados por uma grande variedade de compostos.

1.2.1. Hidratos de carbono

Dos açúcares existentes no vinho, a glucose e a fructose são as hexoses mais importantes, e a arabinose e xilose são as pentoses em maior abundância ⁵. As suas estruturas encontram-se na Figura 1. No caso dos vinhos secos existe uma quantidade de açúcar residual que não é metabolizado, cerca de 1 a 2 g/L.

Em enologia, as expressões “açúcares redutores” e “açúcares fermentescíveis” são comuns, associadas a açúcares com função aldeído ou cetona.

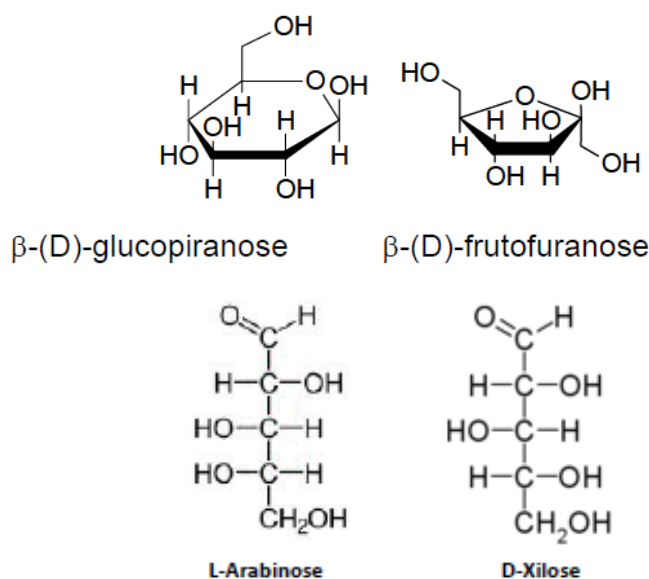


Figura 1: Representação da glucose, fructose, arabinose e xilose ⁵.

1.2.2. Álcoois

Depois da água, que representa cerca de 85 a 90% do volume do vinho, o etanol é o constituinte em maior abundância, variando entre 9 a 14%. O glicerol é o segundo álcool em concentrações mais elevadas, estando presente entre 5 a 20 g/L ⁵.

O 2,3-butanodiol está presente nos vinhos em quantidades entre 0,3 e 1,35 g/L. Existem outros polióis, álcoois poli-hidroxilados resultantes das aldoses, também presentes no vinho, mas em quantidades muito inferiores, como é o caso do arabitól, do manitol e sorbitol ⁵. A maior parte destes álcoois são produzidos durante a fermentação alcoólica. Na Tabela 1 encontram-se os álcoois mais importantes presentes no vinho, bem como as respectivas quantidades em que são encontrados.

Tabela 1: Álcoois mais importantes encontrados no vinho.

Fórmula	Álcoois	Concentração no vinho
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Etanol	40 – 130 g/L
$\text{OH}-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2-\text{OH}$	Glicerol	5 – 20 g/L
$\text{H}-\text{CH}_2\text{OH}$	Metanol	8 – 269 mg/L
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	1-Propanol	5 – 125 mg/L
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	1-Butanol	0,003 - 8,5 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	2-Metil-propan-1-ol	9 – 174 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	2-Metil-butan-1-ol	87 – 564 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	3-Metil-butan-1-ol	87 – 564 mg/L
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	2-Fenil-etanol	4 – 197 mg/L
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2\text{OH}$	Hexanol	0,3 – 12 mg/L

1.2.3. Ácidos orgânicos

No mosto, os ácidos orgânicos em maior percentagem são o tartárico e o málico, já os ácidos succínico e cítrico são os ácidos presentes em menor quantidade ⁶. As suas estruturas estão representadas na Figura 2.

Os ácidos orgânicos representam o principal contributo para a composição, estabilidade e qualidades organolépticas dos vinhos ⁵. No vinho é necessário fazer a distinção dos ácidos que estão presentes vindos directamente das uvas, como é o caso dos ácidos tartárico, málico e cítrico, dos ácidos que são oriundos nos processos fermentativo, como o ácido succínico, láctico e acético ⁶.

No vinho, o ácido tartárico é o que se encontra em maior concentração, de 2 a 6 g/L, sendo um parâmetro crítico para o controlo de estabilização do vinho. O ácido málico e cítrico encontram-se em concentrações de 1-6,5 g/L e de 0,5-1 g/L, respectivamente. O ácido succínico e o ácido láctico rondam os 0,5 g/L no vinho ⁷.

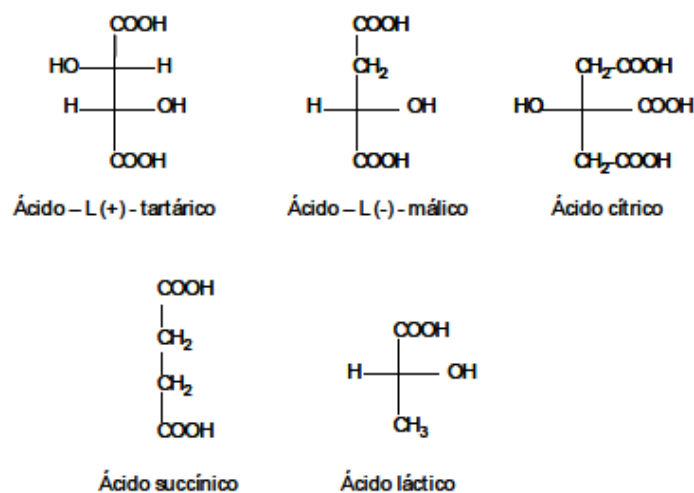


Figura 2: Estrutura dos ácidos orgânicos mais importantes encontrados nos vinhos ⁷.

O ácido acético é o ácido orgânico de cadeia alifática mais importante, estando presente em concentrações de 0,1 a 0,4 g/L. É um subproduto das leveduras da fermentação alcoólica e das bactérias lácticas e acéticas.

Para controlar o processo de maturação das uvas podem ser estudados o teor de ácido tartárico e de ácido málico que estas possuem ⁷. A análise do teor de ácidos orgânicos permite controlar a acidez nas diferentes fases de produção de vinho. Além disso, têm grande importância na detecção de alterações no vinho, devido à modificação do conteúdo ácido. Com o objectivo de identificar e quantificar os ácidos orgânicos mencionados em mostos e vinhos, vários métodos foram desenvolvidos; como métodos espectrofotométricos não enzimáticos e enzimáticos, para caracterizar os ácidos individualmente, e métodos cromatográficos e electroforéticos para identificar grupos de vários ácidos simultaneamente.

1.2.4. Constituição azotada

Na vinificação, na conservação ou estabilização dos vinhos, os constituintes azotados das uvas são de grande importância. Quantitativamente, o seu valor pode chegar aos 15-20% de extracto seco.

A fracção inorgânica encontrada é na forma de catião amónio (NH_4^+) e a fracção orgânica engloba os aminoácidos, oligopeptídeos, polipeptídeos, proteínas, amidas, aminas biogénicas, ácidos nucleicos, açúcares aminados e pirazinas ⁵.

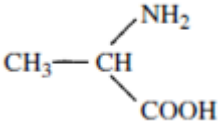
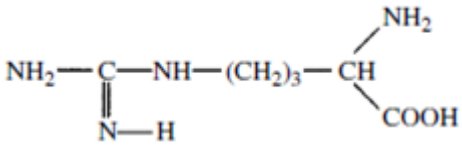
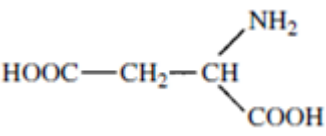
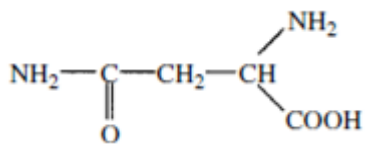
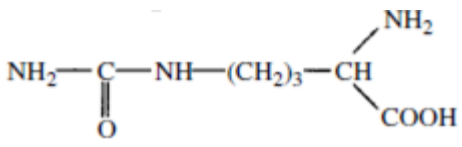
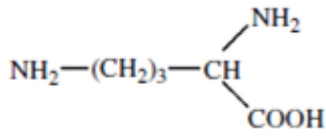
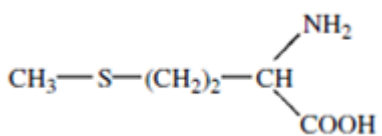
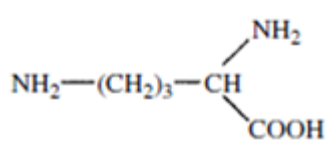
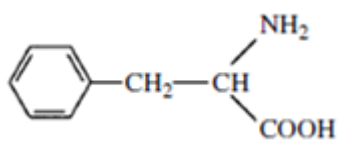
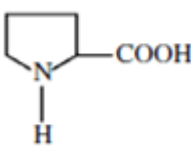
Os aminoácidos, Tabela 2, são uma fonte importante de azoto em mostos e vinhos e a sua concentração livre varia entre 1 e 4 g/L, sendo que aqueles que se encontram em maior quantidade no vinho são a alanina, a serina, a arginina e a prolina, e também o ácido glutâmico e a sua forma de amida, a glutamina. A asparagina e a glutamina representam a família das amidas ⁷.

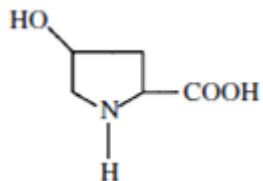
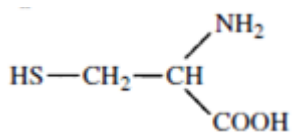
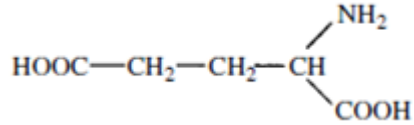
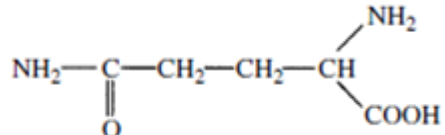
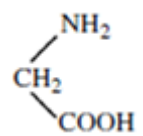
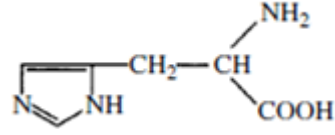
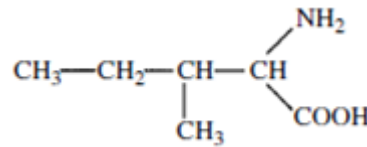
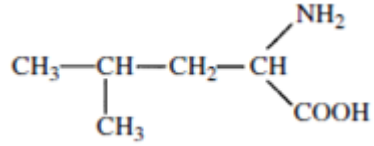
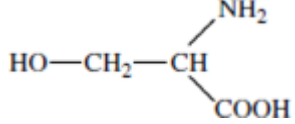
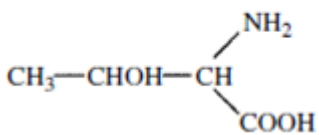
As aminas biogénicas são de origem bacteriana, por descarboxilação dos aminoácidos, e são particularmente controladas devido aos efeitos nocivos para a saúde humana, não podendo exceder os 10 mg/L de vinho.

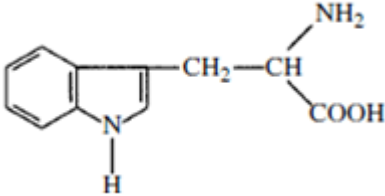
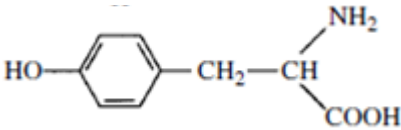
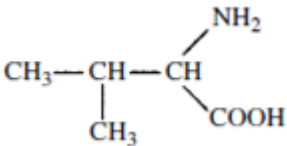
As pequenas quantidades de glucosamina e galactosamina representam os açúcares aminados do vinho.

As pirazinas são moléculas heterocíclicas com dois átomos de azoto.

Tabela 2: Aminoácidos encontrados nos vinhos ⁴.

Aminoácido	Estrutura	Abreviatura
Alanina		Ala
Arginina		Arg
Ácido aspártico		Asp
Asparagina		Asn
Citrulina		Cit
Lisina		Lys
Metionina		Met
Ornitina		Orn
Fenilalanina		Phe
Prolina		Pro

Hidroxi-3-prolina		Hypro
Cisteína		Cys
Ácido glutámico		Glu
Glutamina		Gln
Glicina		Gly
Histidina		His
Isoleucina		Ile
Leucina		Leu
Serina		Ser
Treonina		Thr

Triptofano		Trp
Tirosina		Tyr
Valina		Val

1.3. Controlo de qualidade do vinho e mosto

O controlo de qualidade de vinho e mosto é uma necessidade crescente, essencialmente pela grande variabilidade de compostos químicos que se formam durante a fermentação do vinho.

O Regulamento 2676/90 da Comissão de 17 de Setembro de 1990 determina os métodos comunitários aplicáveis ao sector do vinho. Existe ainda o compêndio dos métodos internacionais de análise de vinhos e mostos, editado pela OIV, que auxilia no controlo de qualidade necessário efectuar aos vinhos e mostos ⁸.

1.3.1. Análise de mosto e vinho

Os métodos espectroscópicos, espectrofotométricos e separativos são considerados os mais simples e, por isso, amplamente utilizados para a caracterização das amostras de vinho ⁹.

A espectroscopia de infravermelho associada a transformada de Fourier (FTIR) permite uma análise rápida e reprodutível de vários parâmetros simultaneamente de uma amostra, com necessidade de preparação da amostra mínima ou mesmo nenhuma ^{9, 10}. No entanto, esta tecnologia deve ser usada com cautela uma vez que necessita de validação analítica.

1.3.2. Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho proporciona vantagens nas áreas da produção e controlo de qualidade. De tal modo, que é notória a crescente importância que lhe é atribuída quer em laboratórios de análise, quer no controlo de qualidade dos processos industriais, tais como na indústria farmacêutica, alimentar, têxtil ou petroquímica.

Este facto é justificado pelas suas potencialidades, que se traduzem na realização de uma análise sem destruição e, muitas vezes, sem tratamento prévio das amostras, na robustez do aparelho, na rapidez e facilidade de execução bem como na selectividade da técnica ¹¹.

A designação “espectroscopia” é aplicada às técnicas que utilizam transmissão, absorção ou reflexão de energia radiante que incide numa amostra, com o objectivo de retirar informação acerca da sua composição ¹². Os resultados são espectros, em função do comprimento de onda ou da frequência.

A espectroscopia de infravermelho (IV) baseia-se no facto das ligações químicas possuírem frequências de vibração específicas quando expostas à radiação infravermelha, que correspondem aos níveis de energia das moléculas, os níveis vibracionais ¹³. As vibrações moleculares são os modos de alongamento e de flexão, que variam de acordo com a forma da superfície da energia potencial, da geometria molecular, das massas dos átomos e até do acoplamento de vibrações (Figura 3). As vibrações moleculares conduzem à absorção energética, induzindo as transições moleculares, tendo como resultado a transição do estado fundamental a estados excitados de maior energia ¹⁰.

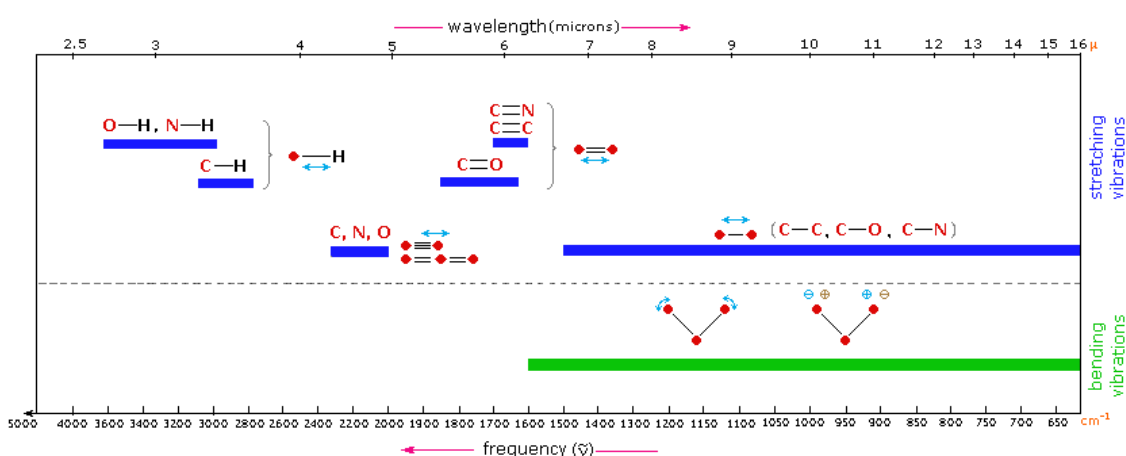


Figura 3: Vibrações moleculares.

Estas absorções traduzem-se em bandas, que podem ser de dois tipos principais: harmónicas e bandas de combinação. O primeiro resulta da excitação das moléculas do estado de energia fundamental para estados mais energéticos e correspondem a frequências múltiplas da absorção fundamental; as segundas surgem de frequências que vibram acopladamente, surgindo frequências correspondentes a somas ou diferenças de duas frequências fundamentais ¹⁴.

A espectroscopia de infra-vermelhos com transformada de Fourier, FTIR, permite obter o espectro de infravermelho mais rapidamente, pois a frequência da luz infravermelha monocromática não vai sendo variada, em vez disso, todos os comprimentos de onda são usados e conduzidos para um interferómetro. O interferómetro possui um laser interno de referência, cuja frequência é conhecida com exactidão e bastante precisa, tornando-se um padrão interno de calibração do comprimento de onda ^{10, 14-15}.

A informação de todas as frequências é recolhida simultaneamente, permitindo fazer leituras múltiplas da amostra e a sua posterior média, aumentando assim a sensibilidade da análise. É, então, obtido um interferograma, ao qual é aplicado transformada de Fourier para ser obtido um espectro idêntico ao da espectroscopia de infravermelho convencional ou dispersiva.

O FTIR permitiu aumentar a sensibilidade e diminuir o tamanho da amostra a usar relativamente ao espectrómetro de infravermelho dispersivo ^{14, 16}.

1.4. FTIR na análise de mostos e vinhos

O vinho contém vários compostos na forma molecular e iónica capazes de absorver energia de comprimentos de onda na gama dos infravermelhos, visível e ultravioletas. Através da passagem de radiação nestas gamas do espectro, estes compostos emitem radiação com comprimentos de onda perfeitamente definidos de acordo com a sua estrutura ¹⁸. Assim, é possível traçar uma “impressão digital” de cada composto, presente numa determinada concentração e, consequentemente, obter um espectro único para cada vinho ^{10, 17}.

Através da integração dos espectros por Transformada de Fourier e recorrendo a uma recta de calibração definida com vinhos padrão, é possível determinar com exactidão a concentração dos vários compostos que caracterizam o vinho, obtendo através de uma única metodologia, todos os parâmetros físico-químicos que qualificam este produto.

O uso de FTIR na área da enologia é um método muito promissor e começa a ser bastante utilizado na determinação destes vários parâmetros físicos e químicos. As principais vantagens desta técnica são a rapidez, a precisão, elevado grau de autonomia, boa resolução média; permitindo uma rápida análise de vários parâmetros simultaneamente, com um gasto de amostra e reagente mínimo ^{10, 11}.

A aplicação de espectroscopia de FTIR à análise de mostos e vinhos é um método analítico indirecto, sendo uma alternativa ao método de análise convencional.

Quer os compostos orgânicos, quer os inorgânicos podem ser determinados através da correlação do espectro IV com os resultados analíticos de referência obtidos. Através da lei Beer-Lambert, sabe-se que a concentração do composto a determinar é directamente proporcional à absorvância num determinado comprimento de onda ¹⁰. No entanto esta relação é afectada pela presença de todos os restantes compostos que absorvem nesse mesmo comprimento de onda. Por isso, é necessário um instrumento que meça múltiplos comprimentos de onda para as interferências serem compensadas.

A análise multivariada relaciona as medidas realizadas num sistema ou processo químico através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos, quantificando os constituintes de uma matriz complexa sem eliminar os seus interferentes ¹⁷. O uso da quimiometria para calibração, validação e comparação dos principais constituintes que se pretende determinar no vinho é indispensável.

Deste modo, o valor analítico dos parâmetros a determinar é obtido por aplicação de um algoritmo ao modelo espectral de resposta, em que as contribuições de interferentes são compensadas. Por isso, há a necessidade de fazer calibrações analíticas específicas, através da quantificação dos parâmetros a analisar por métodos clássicos. Os algoritmos incorporados seleccionam grupos de comprimentos de onda para criarem uma equação linear que melhor se adequa aos valores de referência. Assim, o equipamento faz a selecção dos comprimentos de onda específicos de cada parâmetro, comparando-os com os comprimentos de onda de referência, ou filtros, de forma a obter as razões entre estas absorvências ^{10, 12}.

As regiões entre os 1582-1692 e 2971-3627 cm⁻¹ contêm fortes bandas de absorção de água, que impede a passagem de energia através da célula. A região a partir dos 3627 cm⁻¹ é eliminada por já não possuir informação quase nenhuma.

A validação é o que estabelece a exactidão e precisão e como o modelo se irá adequar às futuras amostras ¹⁷. Para tal, primeiro é necessário seleccionar os comprimentos de onda mais relevantes, seguido de calibração multivariada para optimização da equação de calibração para cada um dos parâmetros.

São necessárias amostras independentes para validar a precisão, a exactidão e a robustez do modelo de calibração.

A informação obtida por análise da amostra não é só por análise directa do espectro mas também pela relação entre o espectro e a resposta obtida. Assim, o modelo vai garantir que as amostras usadas na calibração são representativas e pertencem ao modelo de calibração. O ponto chave da calibração é a base de dados ser o mais representativa possível da matriz e concentrações futuras ^{11,18}.

1.4.1. O sistema Bacchus

O sistema Bacchus é um analisador baseado na espectroscopia de FTIR, permitindo a quantificação, numa única análise, dos parâmetros essenciais do vinho, tais como, álcool, densidade, extracto seco, açúcares, acidez volátil e total, pH e ácidos orgânicos. Este sistema assenta em calibrações analíticas, não sendo necessários reagentes específicos, nem preparação da amostra.

A sua aplicação estende-se a todo o controlo do processo de vinificação, englobando o controlo de maturação, a análise de mosto, de mosto em fermentação e de vinhos.

O programa Bacchus inclui dois módulos: Bacchus Acquisition e Bacchus Quantification. O primeiro é de uso corrente em análises, para obtenção de espectros das amostras, identificação automática de vinhos/mostos, obter calibrações em tempo real ou realizar testes funcionais de robótica e ópticos. O segundo permite desenvolver calibrações através de regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS) e regressão linear múltipla (MLR), permite aceder a ferramentas estatísticas para validações, correlações e variâncias ¹⁹.



Figura 4: Equipamento de FTIR/UV-Vis e amostrador automático usado no laboratório ¹⁹.

A metodologia de análise por FTIR não constitui um processo de análise absoluto, é um método analítico indirecto. É necessário proceder a calibrações específicas para os diferentes tipos de vinhos de acordo com as diferentes matrizes em análise ¹¹. A calibração analítica para todos os parâmetros tem como base os métodos analíticos clássicos, sendo que os resultados aí obtidos são usados como referência para a calibração do equipamento de FTIR.

O valor analítico do parâmetro a determinar é obtido pela aplicação de um algoritmo onde as interferências são compensadas relativamente ao valor que adviria da ponderação directa das absorvências nos diversos comprimentos de onda.

O equipamento selecciona, para cada parâmetro, n comprimentos de onda que apresentam maior variação estatística relativamente aos resultados analíticos de referência. A calibração consiste em calcular coeficientes (B_0, B_1, \dots, B_n) para cada comprimento de onda seleccionado usando correlações matemáticas ^{11, 37}.

Os comprimentos de onda de um espectro de infravermelho de uma amostra de vinho e as absorvências significativas (A_1, A_2, \dots, A_n) permitem o cálculo dos resultados de FTIR para determinado parâmetro ³⁷:

$$FTIR_i = B_1.A_1 + B_2.A_2 + \dots + B_n.A_n + B_0$$

1.5. Métodos clássicos

1.5.1. Açúcares redutores

Os mostos e os vinhos contêm naturalmente pentoses e hexoses, tradicionalmente designadas por “açúcares redutores”, devido ao seu elevado potencial redutor, em quantidades bastante significativas. Qualitativamente, as hexoses da uva, especialmente a glucose e a frutose, constituem os seus mais importantes constituintes, pois determinam decisivamente o teor alcoólico dos vinhos obtidos.

Segundo o OIV e os métodos oficiais, entende-se por açúcares redutores o conjunto dos açúcares com função aldeídica e cetónica que lhes confere poder redutor sobre uma solução cuproalcalina. Redução de uma solução cupro-alcalina ²⁰ por titulação (Método de Lane e Eynon (1923)) é o método usado.

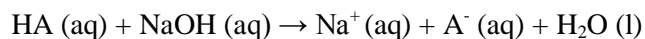
1.5.2. Acidez Total

A constituição ácida dos vinhos é uma das características mais importantes e determinantes dos vinhos, determinando alguns dos principais factores condicionantes dos equilíbrios físico-químicos. A acidez nos vinhos condiciona a actividade dos microorganismos durante a vinificação e a evolução dos vinhos ao longo das diferentes fases; determinando as suas características organolépticas, assegurando a protecção dos mostos e vinhos contra a ocorrência de perturbações na sua correcta evolução natural.

Os diferentes ácidos presentes nos vinhos podem ter origens distintas, podem ser provenientes das uvas, da actividade de diferentes microorganismos (leveduras, bactérias acéticas ou bactérias lácticas), de processos químicos naturais verificados durante a evolução dos mostos e vinhos ou de acção tecnológica (como o recurso à adição de correctivos ácidos).

Entende-se por acidez total de uma bebida alcoólica ou espirituosa a acidez titulável a pH 7 ⁸, não sendo compreendida a devida ao ácido carbónico e ao dióxido de enxofre livre e combinado.

O princípio do método para a determinação da acidez total baseia-se na NP-2139 ²¹. Consiste numa titulação ácido-base recorrendo ao hidróxido de sódio como titulante e azul de bromotimol como indicador. A reacção que ocorre pode ser descrita como:



onde HA corresponde aos diferentes ácidos presentes no vinho.

1.5.3. Acidez Volátil

A acidez volátil é definida como a acidez constituída pelos ácidos que pertencem à série acética e que se encontram no vinho quer no estado livre, quer sob a forma de sais ²⁰. Durante a fermentação alcoólica dos açúcares forma-se sempre uma pequena quantidade de ácido acético, o principal ácido volátil. O ácido acético pode resultar da decomposição do ácido cítrico durante a fermentação maloláctica e pela fermentação láctica de pentoses.

A determinação da acidez volátil consiste na separação dos ácidos voláteis por arrastamento numa corrente de vapor de água, seguida de condensação e titulação. O método interno em uso tem por base a NP – 2140 ⁸.

1.5.4. pH

O pH, ou acidez real, é traduzido como sendo a disponibilidade actual de iões H^+ no vinho. Este factor é muito importante em variados aspectos da produção de vinhos, como por exemplo:

- o crescimento e desenvolvimento das leveduras e alguns mecanismos da fermentação;
- o desenvolvimento das bactérias lácticas, sendo o pH um condicionante da fermentação maloláctica, e ainda um factor fundamental do desenvolvimento das bactérias acéticas;
- a actividade de algumas enzimas pectolíticas, interferindo em processos como a clarificação dos vinhos;
- O pH determina as proporções das formas livre/salificada de cada ácido presente no vinho e caracterizado por um dado pK.

O método para determinação do pH encontra-se descrito no Regulamento CEE 2676/90, sendo o valor de pH dado pela diferença de potencial de eléctrodo combinado (referência e medida) imerso no meio em análise ^{8, 21}.

1.5.5. Massa Volúmica

Segundo o OIV, a massa volúmica é o quociente entre a massa de um determinado volume de vinho ou de mosto a 20°C e esse volume. Exprime-se em gramas por mililitro e o seu símbolo é $\rho_{20^\circ\text{C}}$. A importância da determinação da massa volúmica dos vinhos prende-se com a possibilidade de calcular o extracto seco e avaliar o seu teor em açúcares.

A massa volúmica é determinada na amostra por ensaio por areometria ⁸, tendo por base o método baseia-se no Regulamento CEE 2676/90.

1.5.6. Teor Alcoólico Volumétrico

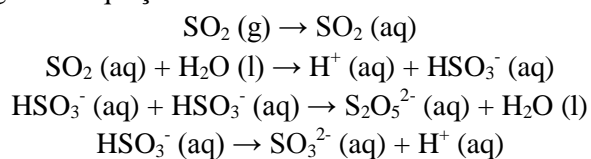
O teor de etanol nos vinhos representa um dos factores de qualidade do produto, quer pela sua expressão quantitativa, quer pela sua origem, pela fermentação alcoólica dos açúcares do mosto por acção das leveduras. Os limites do teor alcoólico são uma das características que definem o tipo de vinho.

O teor alcoólico em volume (ou grau alcoólico volumétrico) de um vinho é caracterizado pelo número de mL de etanol contido em 100 mL desse vinho, sendo estes dois volumes medidos à temperatura de 20°C⁸. A metodologia é baseada na NP-753²⁰, através de destilação simples da amostra alcalinizada e determinação do teor alcoólico do destilado por areometria¹⁸.

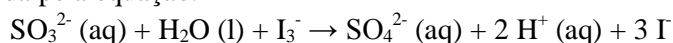
1.5.7. Teor de dióxido de enxofre livre e total

O teor de dióxido de enxofre de uma bebida alcoólica ou espirituosa corresponde o enxofre que se encontra dissolvido no vinho sob a sua forma gasosa, como bissulfito (HSO_3^-) ou sulfito (SO_3^{2-})²⁰. O dióxido de enxofre é adicionado aos mostos e vinhos com base nas suas propriedades antisépticas, de inibição do desenvolvimento de microorganismos; propriedades antioxidantes, uma vez que se liga o oxigénio, formando SO_3 , prevenindo assim oxidações de mostos e vinhos; e propriedades antioxidácicas, inibindo o funcionamento de enzimas oxidativas⁵.

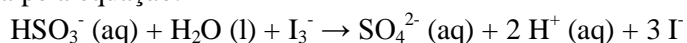
O dióxido de enxofre, pode portanto, encontrar-se sob a forma livre ou combinada, traduzindo-se pelas seguintes equações:



Para determinação do teor de dióxido de enxofre livre efectua-se uma titulação iodimétrica, traduzida pela equação:



Para determinação do teor de dióxido de enxofre combinado é necessário uma nova titulação, mas precedida pela hidrólise das ligações formadas entre o bissulfito e os grupos carbonilo, traduzida pela equação:



O dióxido de enxofre total é a soma do dióxido de enxofre livre e do dióxido de enxofre combinado.

1.6. Azoto facilmente assimilável

A acumulação das substâncias azotadas no bago faz-se através do floema e do xilema. Estão presentes na forma de catião amónio, aminoácidos e polipéptidos. O primeiro tem a sua origem nos nitratos do solo e os restantes são sintetizados pela planta. A passagem para o bago faz-se na forma de catião amónio e de aminoácidos, dos quais a glutamina representa cerca de 50%²².

Com o avançar da maturação, o teor em aminoácidos aumenta devido à diminuição da síntese proteica. A prolina, glutamina e arginina são os aminoácidos mais representativos no final da maturação. No entanto, as proteínas e os polipéptidos não são assimilados pelas leveduras, sendo por isso o seu teor mais ou menos constante ao longo da fermentação ⁴.

O azoto assimilável, que corresponde ao teor em catião amónio, deve ter um teor mínimo no mosto de 150 mg/L para permitir um crescimento normal das leveduras, para uma fermentação saudável. O azoto assimilável é um parâmetro limitante, daí a sua importância, mas não adverso para a actuação das leveduras ²³. O teor de azoto assimilável do mosto pode afectar a composição do aroma do vinho ³².

Quando as leveduras são adicionadas ao mosto começam a metabolizar os açúcares presentes para obterem energia, e utilizam as reservas de azoto para síntese proteica e de bases azotadas ²⁴. Durante as primeiras horas depois da inoculação, a população de leveduras não aumenta; é chamado o período de latência, onde as leveduras se adaptam ao novo ambiente, como representado na Figura 5. Após esta fase, começa o crescimento exponencial, bastante influenciado pela temperatura, pela concentração de amónio, aminoácidos e outros nutrientes, bem como pela presença de oxigénio.

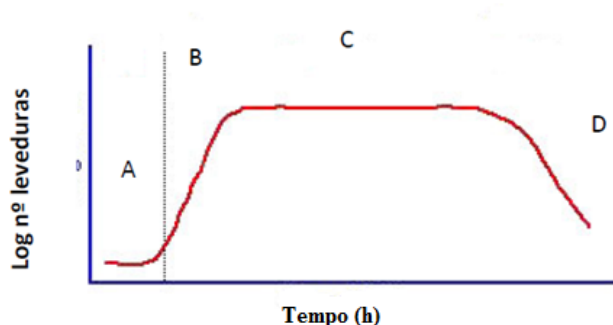
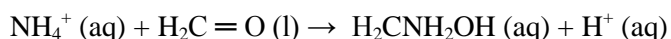


Figura 5: Curva de crescimento das leveduras. A- Fase de latência, B- Fase de crescimento exponencial, C- Fase estacionária, D- Fase de morte ²⁵.

O enriquecimento do teor de azoto dos mostos pode ser feito através da adição de sulfato de amónio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, uma vez que a concentração de azoto disponível nem sempre é suficiente para uma fermentação saudável, reduzindo o tempo em que a mesma se processa. Pela legislação Europeia, a dose máxima autorizada é de 300 mg/L, sendo que os suplementos são normalmente adicionados antes da inoculação do mosto com leveduras ²⁶.

• Método de Sorensen

O teor de amónio pode ser determinado pelo método de Sorensen ou do formol ²⁷. A titulação com formol é um método simples e rápido para determinação da quantidade de azoto assimilável em mostos ^{24, 28}. O mosto é neutralizado com base, depois é adicionado formaldeído em excesso e a solução resultante é titulada até ao ponto de equivalência. O formaldeído reage com o amónio livre, originando perda de protão que pode ser titulado ⁴², traduzindo-se pela seguinte reacção:



Foram realizados ²⁸ estudos que demonstram que trabalhar a pH 8 na neutralização inicial e no ponto de viragem da titulação minimiza os erros associados. A detecção do ponto de

viragem através do pH é um importante aspecto deste método, uma vez que o uso de um indicador não iria garantir a mesma precisão e exactidão.

Posteriormente, o teor de azoto assimilável é calculado através da seguinte expressão ⁴²:

Azoto assimilável (mg N/L) = [(volume NaOH) · (concentração NaOH) · 14 · factor de diluição · 1000]/(volume amostra)

O método do formaldeído apresenta melhores resultados para quantificação de amónio quando comparado ao método de injeção em fluxo ²⁹ ou ao método de fluorescência ³⁰, apresentado resultados de recuperação de amónio mais satisfatórios. Assim, o método de formaldeído apresenta um grau de sensibilidade mais elevado ³¹, podendo ser usado como procedimento de rotina para a determinação do azoto assimilável na indústria enológica.

1.7. Validação de métodos

A norma NP EN ISO 9000: 2000 ³² define "validação" como confirmação, através de evidência objectiva, de que foram satisfeitos os requisitos para uma utilização ou aplicação específicas.

A norma NP EN ISO 17025 refere que devem ser validados os métodos internos, os métodos não-normalizados ou normalizados usados fora do seu âmbito e suas extensões ou modificações. Na validação do método será ainda considerada a sua aptidão para satisfazer os requisitos definidos e demonstrada a sua capacidade técnica ³³.

A validação de um método analítico é imprescindível para a garantia da qualidade analítica, com o objectivo de uniformizar os critérios utilizados. Assim, é garantida a obtenção de resultados com a qualidade exigida, para um determinado método e nas condições em que é praticado. Mesmo processos que envolvam manipulações susceptíveis de acumularem erros, quer sistemáticos ou aleatórios, que poderiam alterar significativamente o resultado final fica salvaguardado. Fica assim demonstrado que o método analítico em causa é adequado ao uso pretendido.

A validação inclui a especificação dos requisitos, determinação das características do método, verificação de que os requisitos podem ser satisfeitos utilizando o método em causa e uma declaração de validade.

Os parâmetros de validação de um método analítico incluem ³³⁻³⁵:

- Gama de linearidade
- Limite de detecção e limite de quantificação
- Precisão: repetibilidade e reprodutibilidade
- Exactidão
- Selectividade do método
- Robustez e influências externas
- Incerteza dos resultados

1.7.1. Gama de linearidade

A linearidade de um método analítico é expressa pela capacidade de um método gerar resultados que sejam directamente proporcionais às concentrações do analito na amostra podendo ser avaliada pelo coeficiente de correlação, r, da recta obtida. Podem também ser

aplicados testes estatísticos para retirar conclusões, como o Teste da Homogeneidade das Variâncias e o Teste da Linearidade ³³. No primeiro realiza-se uma comparação estatística da variância do padrão mais concentrado (S_M^2) com a do padrão menos concentrado (S_m^2) da curva, através das seguintes equações:

$$VT = \frac{S_M^2}{S_m^2} \quad \text{para} \quad S_M^2 > S_m^2 \quad \text{e} \quad VT = \frac{S_m^2}{S_M^2} \quad \text{para} \quad S_m^2 > S_M^2$$

O valor obtido é comparado com valores tabelados pela distribuição de Fisher.

Para o teste de linearidade comparam-se os valores obtidos para:

$$DS^2 = (N-2)s_{y/x(1^\circ)}^2 - (N-3)s_{y/x(2^\circ)}^2$$

$$VT = \frac{DS^2}{s_{y/x(2^\circ)}^2}$$

Onde $S_{y/x(1^\circ)}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração linear e $S_{y/x(2^\circ)}$ da curva de calibração quadrática; com os valores tabelados da distribuição de Fisher.

1.7.2. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção corresponde ao teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com certeza estatística razoável; ou seja, é o início da gama em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística, o sinal do branco do sinal da amostra, e assim indicar se o analito em questão está presente ou não.

Em termos quantitativos, o limite de detecção é obtido por:

$$L.D. = X_0 + K \cdot \sigma_0$$

Onde X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões, preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina; σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 ²⁹.

Partindo do pressuposto que a distribuição é gausseana, então o valor de K é aproximadamente 3,3 para um nível de confiança de cerca de 99,7%. Assim,

$$L.D. = X_0 + 3,3 \sigma_0$$

O limite de quantificação corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação do sinal foi reduzida a valores razoáveis para se efectuar uma detecção quantitativa. Corresponde assim à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão. Quantitativamente, o limite de quantificação é determinado por:

$$L.Q. = X_0 + 10 \sigma_0$$

Onde X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões, preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina; σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

A gama entre o limite de detecção e o limite de quantificação é uma zona de detecção qualitativa e não quantitativa ²⁹.

Assim, o primeiro padrão de calibração deve ser igual ou ligeiramente superior ao limite de quantificação.

1.7.3. Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra ou amostras semelhantes, em condições definidas. A precisão de um método é normalmente expressa em termos de valores de repetibilidade e reprodutibilidade ²⁸.

A repetibilidade de um dado método é a aproximação entre os resultados de medições sucessivas, efectuadas nas mesmas condições de medição, ou seja, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e com os mesmos reagentes. O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, normalmente 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i , X_{i-1}), obtidos nas condições já referidas. Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efectuadas em condições de repetibilidade se $[X_i - X_{i-1}] \leq r$. Para determinar a repetibilidade de um método, no próprio Laboratório, efectuam-se uma série de medições, sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Este procedimento é repetido numa série de amostras, em vários níveis de concentração, cobrindo todo o domínio de aplicação do método.

A estimativa da variação (S_r^2) de um método de análise pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises estudadas nas condições de repetibilidade. Assim, a variância associada à repetibilidade de método de ensaio, para cada nível i de concentração:

$$S_r^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)}$$

Onde:

S_r^2 – variância de repetibilidade associada aos resultados considerados

S_{wi}^2 – variância associada aos resultados considerados

$(n_{wi}-1)$ – graus de liberdade da série de análises

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado por:

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_r = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_r$$

Sendo S_r o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados, ou seja:

$$r = 2,8 \cdot \sqrt{S_r^2}$$

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade (CV_r) para cada nível de concentração, expresso em percentagem, é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100$$

Em que CV_r é numericamente igual ao desvio padrão de repetibilidade (S_{ri}) a dividir pela média dos valores considerados (\bar{x}).

A reprodutibilidade é a aproximação entre resultados das medições, efectuadas com alteração de pelo menos uma das condições de medição, ou seja, laboratório, analista ou equipamentos. O limite de reprodutibilidade (R) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio obtidos nas condições referidas ³⁶.

A repetibilidade e a reprodutibilidade podem exprimir-se quantitativamente através das características da dispersão dos resultados.

1.7.4. Exactidão

A exactidão é um índice que mede a aproximação entre o resultado da medição e o valor verdadeiro. O valor verdadeiro de um parâmetro é dado pelo símbolo μ . A exactidão de um método analítico pode ser determinada através de ensaios interlaboratoriais, de materiais de referência certificados ou por comparação com métodos de referência ³⁶.

Este parâmetro qualitativo pode ser avaliado por testes de significância estatística.

A precisão é definida como o grau de proximidade entre resultados obtidos em réplicas da mesma amostra. A exactidão é geralmente quantificada através dos “erros” enquanto a precisão é medida através dos “desvios”.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de uma determinada metodologia são materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais ou testes comparativos.

1.7.5. Selectividade

A selectividade do método é a capacidade deste identificar e distinguir um determinado analito numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes. A selectividade deve ser estudada usando várias amostras, desde soluções padrão a misturas de matrizes complexas ou elementos considerados potenciais interferentes; podendo ser demonstrada como o desvio dos resultados obtidos pela análise do analito em causa em amostras fortificadas com todos os potenciais interferentes e os resultados obtidos com amostras não fortificadas ³⁴.

1.7.6. Robustez

A robustez do método define-se pela capacidade que um método tem para resistir a pequenas variações durante a sua execução. Os testes de robustez avaliam a alteração a parâmetros identificados à partida como críticos ³⁶. Assim, irá evidenciar as etapas do método em que o rigor é crítico e aquelas em que existe alguma tolerância.

2. Objectivos

Esta dissertação decorre de um estágio curricular na empresa Dão Sul. O primeiro objectivo foi a integração no laboratório de análises químicas, na parte referente ao controlo de qualidade de mostos e vinhos, de acordo com o definido pelos métodos internos. Assim, na época de vindimas de 2010, foi acompanhado o controlo de maturação das uvas para marcação da data de vindima. Após a recepção das uvas na adega, foram controlados alguns parâmetros analíticos, como massa volúmica, teor alcoólico provável, pH e acidez total; e seguidamente foi ainda realizado controlo de fermentação dos mostos, análise de mostos em fermentação e de vinhos.

O segundo objectivo foi a recalibração periódica de rectas de calibração na análise de FTIR a mostos e vinhos. Foram ajustadas rectas de calibração já existentes e implementadas novas rectas para os parâmetros teor alcoólico, acidez volátil, acidez total, pH e açúcares redutores, para análise de espumantes bruto e meio seco; permitindo assim uma rápida análise das amostras. Foram ainda efectuados ensaios para a implementação do método de análise do parâmetro azoto assimilável em mostos no laboratório, e foi testada a inclusão desse parâmetro na análise de mostos no FTIR.

3. Materiais e Metodologias

3.1. Açúcares Redutores

O método interno para a determinação de açúcares redutores (AR) traduz-se na redução de uma solução cupro-alcalina por titulação (Método de Lane e Eynon (1923)).

Num erlenmeyer de 250 mL, colocam-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, 50 mL de água destilada e reguladores de ebulição. Coloca-se o erlenmeyer em fervura, juntam-se 3 gotas de solução de azul-de-metileno a 1% e titula-se com a amostra, até que desapareça a cor azul intensa. A titulação tem que decorrer no tempo máximo de 3 minutos, sempre em ebulição e agitação ²¹.

Com o volume gasto na titulação determina-se a quantidade de açúcares redutores: $AR (g/L) = 50/V$ (volume gasto de amostra em mL).

3.2. Acidez Total

Medem-se 2 mL de amostra para um erlenmeyer e adiciona-se uma gota de azul de bromotimol. Titula-se com hidróxido de sódio 0,1 M até ao aparecimento da coloração azul-esverdeada. Regista-se o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação (V).

O teor de acidez total (AT) na amostra é dado por:

$$AT = V \times 3,75$$

onde V é o volume, em mL, da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação. A acidez total é expressa em gramas de ácido tartárico por litro, uma vez que o ácido tartárico é o ácido maioritário presente no vinho, podendo mesmo atingir dois terços do total de ácidos.

A repetibilidade interna do método é de 0,30 g/L de ácido tartárico.

3.3. Acidez Volátil

Introduzem-se no gerador de vapor cerca de 250 mL de água desionizada. Medem-se rigorosamente 10 mL de amostra para o chapinador. Adicionam-se 0,5 g de ácido tartárico. Deixa-se a água ferver durante 2 minutos, colocando-se de seguida o taco de vidro e deixa-se que o vapor de água, passando através do tubo abductor, borbulhe no vinho e arraste no destilado todos os ácidos voláteis, até serem obtidos 100 mL de destilado.

Titula-se o destilado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador, até ao aparecimento de uma leve, mas persistente coloração rósea. Regista-se o volume gasto (V) e determina-se acidez volátil (AV) por: $AV = V \times 0,6$. O resultado é expresso em g/L em ácido acético e a repetibilidade do método é de 0,20 g/L de ácido acético.

3.4. pH

O medidor de pH, um potenciómetro, é calibrado antes de cada utilização com soluções padrão de pH. A calibração do potenciómetro efectua-se a 20°C, seguindo as indicações dadas para o aparelho, com as soluções-tampão de pH 7,00 e 4,01 a 20°C. Mergulha-se o eléctrodo na amostra a analisar, cuja temperatura deve estar compreendida entre 20 e 25°C e tão próxima quanto possível dos 20 °C.

3.5. Título alcoométrico volúmico

Preenche-se um balão marcado de 250 mL com a amostra e regista-se a temperatura. Transfere-se para o balão do aparelho de destilação, lavando o balão quatro vezes com 5 mL de água de cada vez e introduzindo essas porções de água no balão de destilação. Adicionam-se 10 mL solução de hidróxido de potássio 1 M até à alcalinização, observada pela variação da cor da amostra. Juntam-se alguns fragmentos de pedra-pomes. Aquece-se à ebulição numa manta de aquecimento e recolhem-se 220 mL de destilado no mesmo balão que serviu para medir a amostra e onde previamente se introduziram 10 mL de água. Agita-se e perfaz-se o volume com água destilada à temperatura a que inicialmente se mediu a amostra ($\pm 2^{\circ}\text{C}$).

De seguida, coloca-se o destilado numa proveta cilíndrica e introduz-se o termómetro. Homogeneíza-se o destilado com o termómetro e efectua-se a leitura da temperatura decorrido 1 minuto. Retira-se o termómetro e introduz-se o alcoómetro, fazendo a leitura do teor alcoólico aparente após 1 minuto de repouso.

3.6. Massa Volúmica

Colocam-se cerca de 230 mL de vinho a analisar na proveta. Homogeneíza-se a amostra. Introduce-se o termómetro na proveta e efectua-se a leitura decorrido 1 minuto. Retira-se o termómetro, introduzindo de seguida o areómetro. Aguarda-se 1 minuto e lê-se, na haste deste e por cima do menisco, o valor da massa volúmica em mg/mL. A repetibilidade interna do método é de 0,0001 g/mL.

3.7. Controlo de maturação

Colhe-se uma amostra de 200 bagos de todas as zonas do cacho, expostas e não expostas, e de videiras em diferentes locais da vinha. Contam-se e pesam-se os bagos. De seguida esmagam-se os bagos. O mosto resultante é colocado numa proveta graduada para fazer a medição do volume e da massa volúmica do mosto obtido.

3.8. Dióxido de enxofre livre e total

O teor de dióxido de enxofre livre é determinado por titulação iodométrica directa. Num erlenmeyer introduzem-se 25 mL de amostra e adicionam-se 5 mL de ácido sulfúrico 0,25 M e 3 mL de cozimento de amido a 0,5 g/100 mL. Titula-se com a solução de iodo 0,03125 N até que a coloração azul do indicador persista nitidamente. O teor de dióxido de enxofre livre, expresso em miligramas de SO_2 por litro, é dado por: V (o volume, em mL, da solução de iodo gasto) x 40.

O teor de dióxido de enxofre total é determinado pelo método rápido de Ripper, consistindo na titulação iodométrica em meio ácido, após dupla hidrólise alcalina na amostra cujo “ SO_2 ” livre foi oxidado. Num erlenmeyer introduzem-se 25 mL de amostra e adicionam-se 10 mL de hidróxido de potássio 1 M e deixa-se repousar durante 5 minutos. Depois adicionam-se 5 mL de ácido sulfúrico 0,25 M e 3 mL de cozimento de amido a 0,5 g/100 mL. Titula-se com a solução de iodo 0,03125 N até que a coloração azul do indicador persista. O cálculo do teor de dióxido de enxofre total na amostra é igual ao livre, multiplica-se o volume de iodo gasto na titulação por 40.

3.9. Azoto – Método de Sorensen

Num copo colocam-se 100 mL de mosto e adiciona-se NaOH 0,1 M até atingir o pH de 8. Adicionam-se 10 mL de BaCl₂ 1 M. Após 15 minutos, perfaz-se o volume de 200 mL com água desionizada, agita-se e filtra-se. Retiram-se 100 mL de solução filtrada, aos quais se ajusta novamente o valor de pH para 8, caso seja necessário. Adicionam-se 25 mL da solução de formaldeído e agita-se. Titula-se a solução com NaOH 0,05 M até atingir novamente pH de 8. Regista-se o volume gasto (V) e determina-se o teor de Azoto Facilmente Assimilável, em mg/L, por: $28 \times V$.

3.10. Equipamento WineScan Sistema Bacchus

O sistema Bacchus é constituído pelos seguintes componentes:

- Espectrómetro de FTIR AVATAR 380 da Thermo-Nicolet, responsável pela análise espectroscópica propriamente dita;
- Amostrador automático M.S.U. com 30 posições divididas por dois níveis, onde são colocadas as amostras a serem analisadas;
- Módulo automático electrónico com função Peltier, consistindo na regulação da temperatura da célula de leitura de $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (através de um circuito que envolve um líquido refrigerador), permitindo assim que não seja necessário a termostatização da amostra; outra função muito importante desempenhada pelo módulo é ligar o espectrómetro AVATAR e o amostrador através de uma bomba que permite o fluxo da amostra até à célula de leitura, e controlar todos os aspectos inerentes a essa ligação.
- Computador com os programas Bacchus Acquisiton e Bacchus Quantification instalados, pois estes programas constituem a interface entre o equipamento e o operador e apresentam diferentes funcionalidades:
 - Bacchus Acquisition – análise de amostras, ajuste dos parâmetros relacionados com as amostras, visualização dos resultados, selecção e optimização de diferentes calibrações, gestão de utilizadores, manutenção do equipamento (programa de lavagens), realização de teste de robótica e da componente óptica;
 - Bacchus Quantification – apresentação gráfica dos espectros e sua análise, criação de novas calibrações por dois métodos diferentes: PLS (Partial Least Squares) e MLR (Multiple Linear Regrassion).

Na primeira utilização diária é necessário executar o teste do banco óptico, para que se faça uma verificação do funcionamento do sistema. Selecciona-se o ícone fazer análises, selecciona-se o produto, introduz-se o número de amostras no campo correspondente e introduz-se o nome das amostras. Iniciam-se as análises clicando em iniciar.

3.11. Rectas de calibração

O programa do equipamento Bacchus contem de origem uma base de dados com várias curvas de calibração correspondentes a vários parâmetros analisados em vinhos e derivados. No entanto, estas curvas não se encontram optimizadas para os diferentes tipos de matrizes de vinhos analisados nos diferentes laboratórios, necessitando por isso de ajuste à realidade das

amostras. Procede-se então à correcção das calibrações existentes no programa Bacchus Acquisition que permita obter resultados fiáveis para os parâmetros a analisar. Assim, um produto é entendido como sendo uma curva de calibração ou um conjunto de curvas de calibração relativas a um parâmetro individual ou a vários parâmetros diferentes. O procedimento geral é:

- Criação de um novo produto de calibração – para cada parâmetro, o FTIR apresenta várias opções de calibração; assim para cada tipo de amostra a analisar, como espumante, vinho ou mosto, é criado um conjunto de rectas de calibração que serão posteriormente utilizadas e reavaliadas semestralmente.
- Análise das amostras – escolha das amostras a serem utilizadas para ajuste das curvas de calibração, com análise dos parâmetros em estudo, por métodos internos e por FTIR
- Introdução dos valores de referência – como os valores obtidos por FTIR são diferentes dos obtidos anteriormente, é feita a substituição dos valores obtidos pelo FTIR pelos valores de referência de cada amostra.
- Ajuste das curvas de calibração – após as substituições anteriores são eliminados os pontos correspondentes a amostras cujos valores de referência são significativamente diferentes dos valores do FTIR, sendo que o critério de aceitação desta diferença é característico para cada parâmetro e estabelecido pelo laboratório. A escolha da curva de calibração é feita com base na que possuir maior coeficiente de correlação e valor de declive mais próximo da unidade.
- Criação do produto final – selecção de todas as curvas de calibração ajustadas escolhidas, para um ou vários parâmetros.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise de mostos e vinhos

4.1.1. Controlo de maturação e fermentação/vinificação

O controlo de maturação das uvas é feito através da colheita de bagos no campo por amostragem em quantidade suficiente para fazer uma avaliação físico-química correcta da evolução da vinha. Este controlo é feito para a determinação da época de vindima, com base na evolução das características das uvas recolhidas.

Assim, são recolhidas amostras em diferentes dias e são analisados os parâmetros massa volúmica (MV), pH e acidez total (AT). A partir da massa volúmica do mosto, corrigindo o seu valor para a temperatura de 20°C, determina-se o teor alcoólico provável (TAP) e a quantidade de açúcares presentes, recorrendo a uma tabela de correspondência entre a massa volúmica e o rendimento alcoólico. As tabelas que relacionam estes parâmetros podem ser consultada nos Anexo II e III.

De seguida são apresentados três exemplos, de uma casta branca e duas tintas, Tabela 3; dos resultados de controlo de maturação obtidos para diferentes castas.

Tabela 3: Controlo de maturação das castas Encruzado, Touriga Nacional e Jaen do ano de 2010.

Tipo	Casta	Data	TAP (%)	pH	Açúcares (g/L)	AT (g/L)	Massa (g)	Volume (mL)	MV (g/mL)	Rendimento
VB	Encruzado	26-Ago-10	8,37	2,90	146,55	12,75	331,30	190,0	1,064	1,74
		2-Set-10	10,13	3,11	177,33	4,50	381,50	212,0	1,076	1,80
		9-Set-10	11,16	3,16	195,28	3,75	356,70	200,0	1,083	1,78
VT	Touriga Nacional	1-Set-10	11,60	3,28	202,97	8,63	364,70	212,0	1,086	1,72
		14-Set-10	12,18	3,43	213,23	7,00	396,10	242,0	1,090	1,64
		24-Set-10	12,65	3,40	220,93	7,13	372,40	206,0	1,093	1,81
VT	Jaen	9-Set-10	10,13	3,20	177,33	4,88	293,60	152,0	1,076	1,93
		15-Set-10	12,48	3,58	218,36	3,75	306,10	127,0	1,092	2,41
		22-Set-10	12,77	3,61	223,49	3,75	434,90	172,0	1,094	2,53

Pode-se verificar que a quantidade de açúcares presentes aumenta com o decorrer do tempo, bem como teor alcoólico provável, devido à maturação das uvas. A acidez total diminui consideravelmente e como consequência ocorre um aumento de pH.

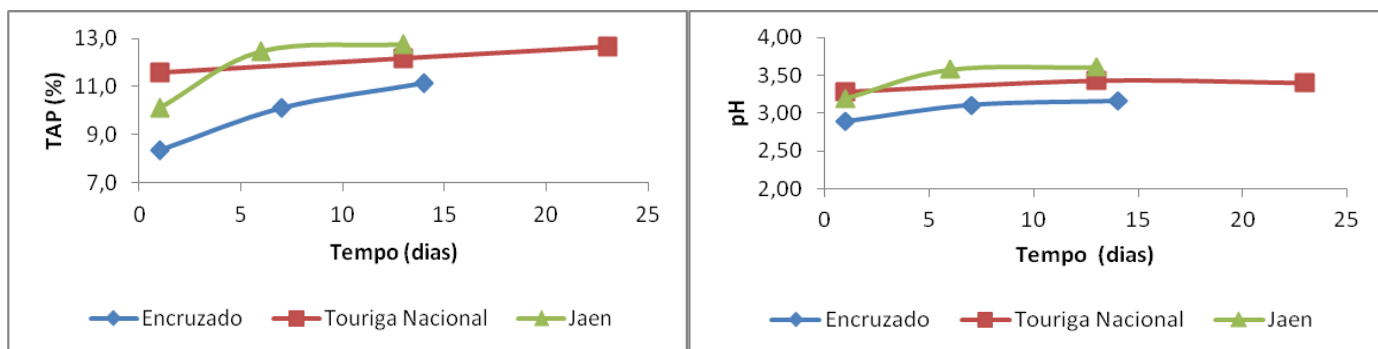


Figura 6: Representação da evolução do teor alcoólico provável (A) e do pH (B) ao longo da maturação das castas Encruzado, Touriga Nacional e Jaen.

Verifica-se na Figura 6A um aumento progressivo no teor alcoólico provável (% v/v) para as três castas em estudo, após valores iniciais de 8,37%, 11,6% e 10,13%, respectivamente Encruzado, Touriga Nacional e Jaen aumentaram para 11,16%, 12,65% e 12,77% . O mesmo é possível verificar para o pH (Figura 6B), o qual aumenta durante a maturação para todas as castas.

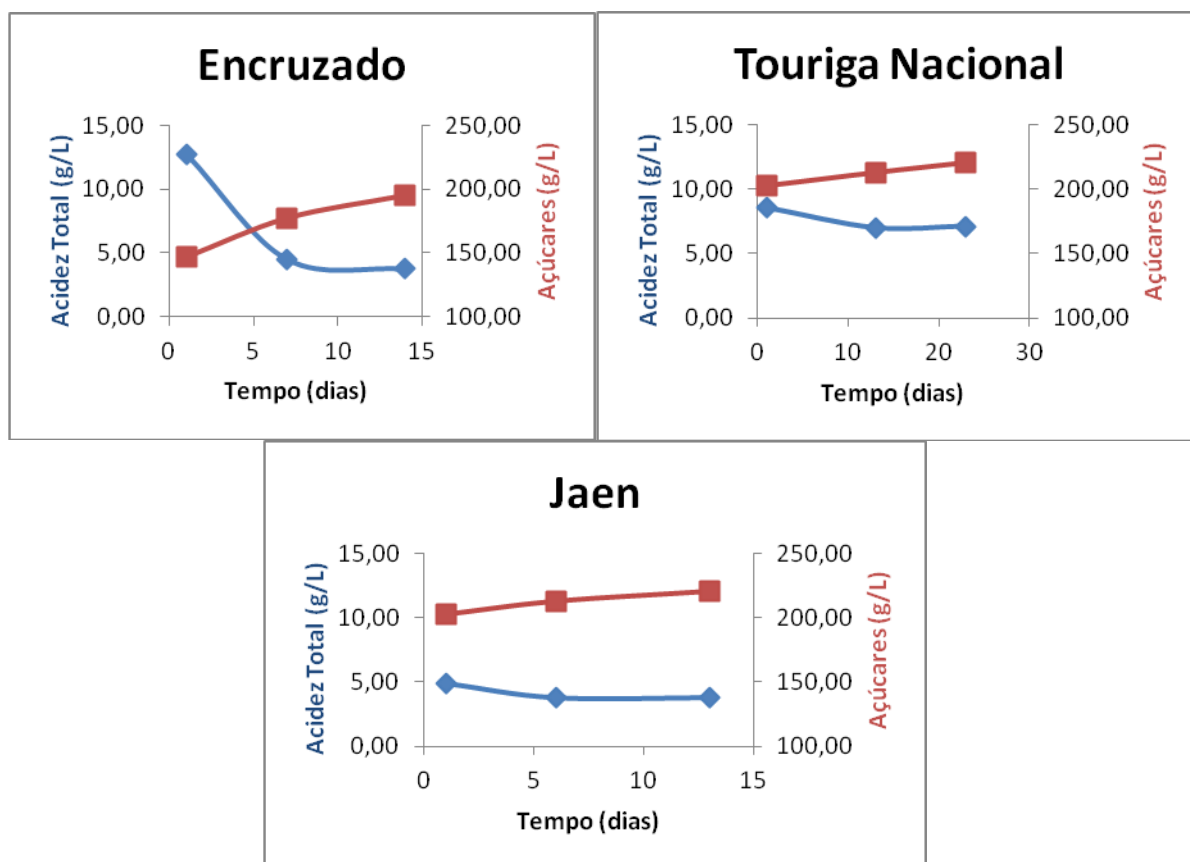


Figura 7: Representação da evolução da acidez total e da concentração de açúcares ao longo da maturação das castas Encruzado, Touriga Nacional e Jaen.

A Figura 7 representa evolução da acidez total e açúcares durante a maturação. A acidez diminui ao longo do tempo e inversamente o teor em açúcar aumenta, para as três variedades e ao longo do período de maturação. A relação entre a acidez e os açúcares explica-se pela conversão dos ácidos em açúcar durante a maturação ²³. Um teor mais elevado de açúcar implica um teor alcoólico provável superior. O TAP verifica-se superior para o Encruzado seguido pelo Jaen e Touriga Nacional.

A legislação estabelece que o teor alcoólico provável tem de ser superior a 9,5%, o intervalo de valores de pH para as uvas à entrada da adega deve pertencer ao intervalo entre 2,9 a 3,8 e que a acidez deverá ser superior a 3,5 g/L em ácido tartárico. Como se verifica na Tabela 3, as três castas na data do último controlo de maturação, encontram-se dentro destes limites, respeitando assim a legislação.

Os mostos são depois inoculados para que ocorra a fermentação alcoólica de forma controlada e sem paragens. Verifica-se a ocorrência da fermentação pela diminuição da massa volúmica do mosto, devido à transformação dos açúcares em álcool, ao longo dos dias. Todos os dias são medidas as temperaturas e as massas volúmicas dos diferentes mostos em adega. Na Figura 8 encontram-se os resultados obtidos a fermentação de três mostos, um branco (VB) e dois tintos (VT 1 e VT 2), verificando-se a diminuição constante da massa volúmica.

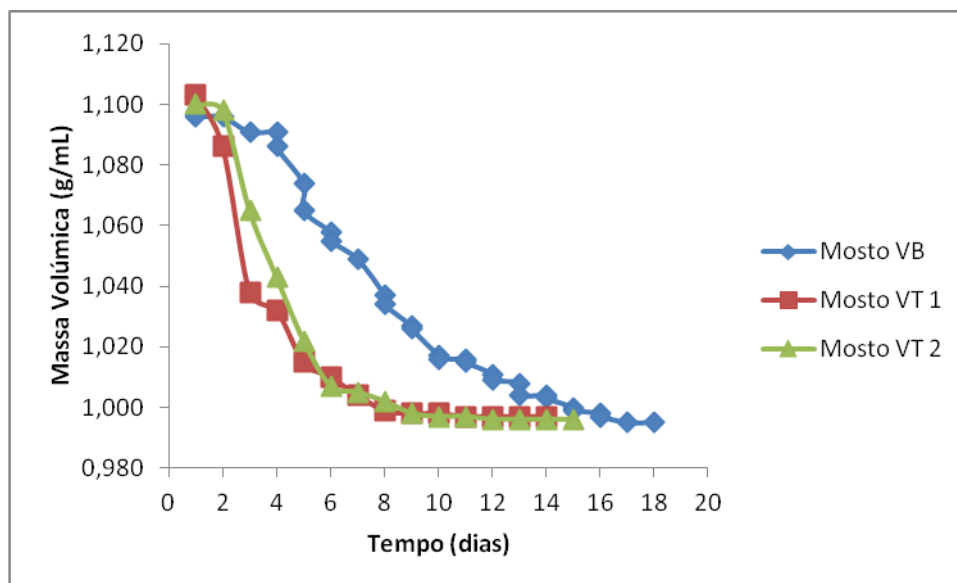


Figura 8: Controlo de vinificação de três mostos, descida da massa volúmica ao longo da fermentação.

São efectuadas análises de controlo, aos parâmetros já referidos, quando o mosto entra no depósito e posteriormente já em final de fermentação para saber se ainda restam muitos açúcares para fermentar, resultados apresentados na Tabela 4. As análises efectuadas ao mosto na entrada da adega (Dia 1) caracterizam as propriedades químicas do mosto que irá fermentar. Pode-se verificar na Tabela 4 os resultados obtidos para os três mostos no primeiro dia e em final de

fermentação; verificando-se que os resultados de teor alcoólico provável para cada mosto estão bastante próximos do teor alcoólico do vinho a que dão origem, sendo portanto um bom indicativo das características químicas a que determinado mosto irá dar origem. Observa-se ainda que devido à fermentação dos açúcares, o seu nível diminui drasticamente ao longo da fermentação.

Tabela 4: Análises efectuadas ao longo da fermentação dos mostos.

Mosto	Dia	TAV (%)	Açúcares (g/L)	pH	AT (g/L)
VB	1	13,06 (TAP)	228,62	3,16	5,25
	15	12,66	8,00	3,26	7,80
	18	12,96	3,80	3,28	7,85
VT 1	1	14,06 (TAP)	246,57	3,90	5,63
	14	14,30	4,90	3,98	8,08
VT 2	1	13,65 (TAP)	238,88	3,72	6,75
	15	13,90	5,80	3,90	7,52

4.1.2. Controlo de vinhos em adega e engarrafados

Os parâmetros analisados em vinhos em depósito ou em vinhos já engarrafados foram o teor alcoólico (TAV), acidez total (AT), acidez volátil (AV), açúcares redutores (AR), pH e teor de sulfuroso total e livre. Dos parâmetros mencionados apenas o teor de sulfuroso não é analisado pelo FTIR. Os restantes possuem rectas específicas de calibração no sistema de FTIR e são analisados por esta técnica.

Foram analisadas várias amostras de vinhos engarrafados e de vinhos ainda em depósito, incluindo vinhos tintos (VT), brancos (VB) e rosés (VR). Os vinhos engarrafados precisam de controlo analítico para confirmar que as suas características e propriedades não foram modificadas durante o processo de engarrafamento por alguma razão. Para os vinhos ainda em depósito é necessário assegurar que as suas características químicas não sofrem alterações enquanto o armazenamento.

Uma vez que as análises dos parâmetros TAV, AT, AV, AR e pH são feitas diariamente pelo laboratório no equipamento de FTIR, é importante assegurar que as rectas implementadas não sofreram desvios significativos após a sua calibração e que os resultados são correctos. Com esse objectivo, foram realizadas algumas análises no FTIR e pelos métodos clássicos para comparação de resultados^{15, 37}.

Uma vez que os vinhos em análise são de regiões distintas, as matrizes em análise são diferentes, com características diferentes entre si, originando variabilidade. Assim, para a calibração do FTIR e para implementação de rectas de calibração são usadas amostras diferentes e de diferentes regiões vitivinícolas para eliminar o efeito de matriz.

De seguida são apresentados os resultados obtidos para várias amostras, para os diferentes parâmetros em análise, pelos métodos clássicos de cada parâmetro e pelo FTIR, e a respectiva diferença existente entre resultados.

Tabela 5: Resultados do TAV obtidos por destilação comparados com FTIR.

Amostra	Tipo de vinho	TAV (%) FTIR	TAV (%) Destilação	Diferença FTIR-Destilação
A	VB	13,44	13,35	0,09
B	VT	13,75	13,70	0,05
C	VT	13,24	13,20	0,04
D	VT	14,28	14,24	0,04
E	VT	13,88	13,63	0,25
F	VT	13,52	13,40	0,12
G	VB	11,61	11,60	0,01
H	VT	15,98	15,60	0,38
I	VT	14,97	14,50	0,47
J	VT	13,86	13,80	0,06
K	VT	14,11	13,90	0,21
L	VB	11,17	11,39	-0,22
M	VT	13,08	13,30	-0,22
N	VB	12,55	12,56	-0,01
O	VR	12,43	12,50	-0,07
P	VT	13,07	13,20	-0,13
Q	VB	11,15	11,50	-0,35
R	VB	12,47	12,46	0,01
S	VT	13,02	13,10	-0,08
T	VT	13,90	13,70	0,20
Média		13,27	13,23	0,04
Desvio Padrão		1,19	1,03	0,20
Variância		1,42	1,07	0,04

Na Tabela 5 encontram-se os resultados do teor alcoólico das amostras. É um parâmetro legislado, tem de ser superior a 9,5%. Todas as amostras possuem teor alcoólico acima desse valor. Além disso é uma das principais características de um vinho, sendo um parâmetro cujo valor tem de constar no rótulo obrigatoriamente e tem uma margem legal de variação de 0,5%.

Para comparação entre os resultados obtidos pelo FTIR e pelos métodos clássicos, foram realizados testes de verificação das variâncias e das médias.

- Teste de verificação das variâncias, baseado no teste de Hipóteses, sendo que:

$$F = Sd_1^2 / Sd_2^2$$

Em que Sd_1^2 e Sd_2^2 são as variâncias associadas aos valores obtidos pelo equipamento e aos valores de referência, respectivamente. Neste teste a Hipótese Nula (H_0) defende que a razão Sd_1^2 / Sd_2^2 tem de ser inferior ou igual a 1. Se o $F_{\text{crítico}}$ com um nível de confiança a 95% para os ensaios efectuados for menor que o F_{exp} então a Hipótese Nula é rejeitada; mas se o $F_{\text{crítico}}$ for maior ou igual que o F_{exp} então não se rejeita a Hipótese Nula, concluindo-se que as variâncias não são estatisticamente diferentes.

Na Tabela 6 encontram-se os resultados para o teste de verificação das variâncias.

Tabela 6: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação do TAV no Bacchus.

$Sd_1(x) = 1,19$	$Sd_1^2(x) = 1,42$	$F_{\text{exp}} = 1,32$
$Sd_2(y) = 1,03$	$Sd_2^2(y) = 1,07$	$F_{\text{crítico}} = 2,51$

Como F_{exp} é menor que $F_{\text{crítico}}$ então a Hipótese nula não é rejeitada, pelo que as variâncias não são significativamente diferentes.

- Teste às médias emparelhadas consiste num teste t a duas amostras emparelhadas para as médias. Segundo este teste, se t_{exp} (P bilateral) for menor que o $t_{\text{crítico}}$ (bilateral) então as médias não são estatisticamente diferentes. Foram obtidos os seguintes resultados:

Número de amostras	20
Graus de liberdade	19
$t_{\text{crítico}}$	2,10
t_{exp}	0,12

Como t_{exp} é menor que o $t_{\text{crítico}}$ então as médias para o parâmetro TAV não são estatisticamente diferentes. Assim, verifica-se que os resultados por destilação e por FTIR não são significativamente diferentes. Deste modo pode-se considerar correctos os valores do FTIR e os seus resultados podem ser aceites pelo laboratório, para a gama de valores apresentados, em substituição dos valores obtidos pela destilação.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados referentes à acidez volátil das amostras. É um parâmetro legislado, nos vinhos brancos e rosés tem de ser menor que 1,08 g/L em ácido acético e em vinhos tintos menor que 1,2 g/L em ácido acético.

Tabela 7: Resultados de AV obtidos comparados com FTIR.

Amostra	Tipo de vinho	AV FTIR (g/L)	AV clássica (g/L)	Diferença FTIR-Clássica
A	VB	0,36	0,40	-0,04
B	VT	0,34	0,39	-0,05
C	VT	0,32	0,34	-0,02
D	VT	0,41	0,40	0,01
E	VT	0,37	0,46	-0,09
F	VT	0,35	0,60	-0,25
G	VB	0,38	0,48	-0,10
H	VT	1,14	0,90	0,24
I	VT	0,70	0,60	0,10
J	VT	0,94	0,74	0,20
K	VT	0,85	0,72	0,13
L	VB	0,68	0,54	0,14
M	VT	0,88	0,81	0,07
N	VB	0,85	0,78	0,07
O	VR	0,71	0,54	0,17
P	VT	0,59	0,54	0,05
Q	VB	0,57	0,54	0,03
R	VB	0,62	0,48	0,14
S	VT	0,55	0,48	0,07
T	VT	0,66	0,54	0,12
	Média	0,61	0,56	0,05
	Desvio Padrão	0,23	0,15	0,12
	Variância	0,06	0,02	0,01

Todos os vinhos apresentados respeitam o limite legal referenciado. Relativamente à comparação do método clássico com os resultados obtidos no FTIR verifica-se que a maior diferença, em módulo, é de 0,25 g/L e a média de diferenças registada foi de 0,05. Na Tabela 8 encontram-se os resultados respeitantes ao teste das variâncias para este parâmetro.

Tabela 8: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação do AV no Bacchus.

$Sd_1(x) = 0,23$	$Sd_1^2(x) = 0,06$	$F_{exp} = 3,00$
$Sd_2(y) = 0,15$	$Sd_2^2(y) = 0,02$	$F_{critico} = 2,51$

Pode-se verificar que F_{exp} é maior que $F_{critico}$, então a hipótese nula é rejeitada, ou seja, as variâncias são estatisticamente diferentes, portanto as amostras são heterogêneas.

- Teste às médias emparelhadas

Número de amostras	20
Graus de liberdade	19
$t_{critico}$	2,10
t_{exp}	0,79

Pelo teste das médias emparelhadas ao parâmetro AV, t_{exp} é menor que o $t_{critico}$ então as médias dos dois métodos não são estatisticamente diferentes. A repetibilidade interna do método é de 0,2 g/L de ácido acético e portanto a grande maioria das diferenças dos resultados está abaixo desse valor, verificando-se assim que os resultados obtidos no FTIR não são significativamente diferentes dos obtidos no método clássico. O laboratório pode então aceitar os valores de acidez volátil obtidos pelo FTIR como correctos e realizar este parâmetro rotineiramente no FTIR.

Na Tabela 9 são apresentados os resultados obtidos para o pH por métodos clássicos e FTIR.

Tabela 9: Resultados de pH obtidos comparados com FTIR.

Amostra	Tipo de vinho	pH FTIR	pH potenciômetro	Diferença FTIR-Clássica
A	VB	3,29	3,29	0,00
B	VT	3,09	3,11	-0,02
C	VT	3,43	3,46	-0,03
D	VT	3,37	3,33	0,04
E	VT	3,40	3,36	0,04
F	VT	3,07	3,08	-0,01
G	VB	3,36	3,36	0,00
H	VT	3,93	3,90	0,03
I	VT	3,67	3,64	0,03
J	VT	3,79	3,68	0,11
K	VT	3,74	3,64	0,10
L	VB	3,71	3,64	0,07
M	VT	3,42	3,42	0,00
N	VB	3,96	3,85	0,11
O	VR	3,76	3,70	0,06
P	VT	3,80	3,62	0,18
Q	VB	4,00	3,95	0,05
R	VB	3,49	3,44	0,05
S	VT	3,73	3,80	-0,07
T	VT	3,67	3,72	-0,05
	Média	3,58	3,55	0,03
	Desvio Padrão	0,27	0,25	0,06
	Variância	0,07	0,06	0,004

O intervalo de valores de referência para os vinhos é 3,0 a 4,0; sendo que todos os resultados se encontram nesse intervalo, não havendo nenhum valor de pH que seja atípico.

A maior diferença entre os resultados de pH no FTIR e no potenciômetro foi de 0,18 e a médias das diferenças foi de 0,03, muito próximo do valor de repetibilidade do método, 0,02; não se verificando muita discrepância de resultados.

Na Tabela 10 apresentam-se os resultados para o teste das variâncias do parâmetro pH.

Tabela 10: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação do pH no Bacchus.

$Sd_1(x) = 0,27$	$Sd_1^2(x) = 0,07$	$F_{exp} = 1,17$
$Sd_2(y) = 0,25$	$Sd_2^2(y) = 0,06$	$F_{crítico} = 2,51$

- Teste às médias emparelhadas

Número de amostras	20
Graus de liberdade	19
t_{critico}	2,10
t_{exp}	0,37

Estaticamente comprova-se que as variâncias e as médias não são significativamente diferentes, pois F_{exp} é menor que F_{critico} para ambos os testes. Os resultados de pH obtidos pela análise de FTIR podem ser considerados correctos e aceites pelo laboratório.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos para a acidez total.

Tabela 11: Resultados de AT obtidos comparados com FTIR.

Amostra	Tipo de vinho	AT FTIR (g/L)	AT clássica (g/L)	Diferença FTIR-Clássica
A	VB	6,59	5,82	0,77
B	VT	7,99	6,75	1,24
C	VT	5,96	4,88	1,08
D	VT	5,62	4,50	1,12
E	VT	6,11	4,88	1,23
F	VT	7,39	5,63	1,76
G	VB	5,97	4,50	1,47
H	VT	6,83	4,50	2,33
I	VT	6,53	4,88	1,65
J	VT	7,13	4,88	2,25
K	VT	7,12	5,07	2,05
L	VB	6,42	4,32	2,10
M	VT	7,24	5,25	1,99
N	VB	6,99	5,25	1,74
O	VR	6,37	4,88	1,49
P	VT	6,99	5,63	1,36
Q	VB	5,50	3,75	1,75
R	VB	6,53	4,50	2,03
S	VT	5,92	4,50	1,42
T	VT	6,13	4,50	1,63
Média		6,57	4,94	1,62
Desvio Padrão		0,64	0,66	0,42
Variância		0,41	0,43	0,18

A legislação determina que a acidez total em vinhos tem de ser superior a 3,5 g/L de ácido tartárico, verificando-se esse valor mínimo em todas as amostras. A maior diferença registada entre o FTIR e o método clássico foi de 2,33 g/L e a médias das diferenças foi de 1,62.

Tabela 12: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação de AT no Bacchus.

$Sd_1(x) = 0,64$	$Sd_1^2(x) = 0,41$	$F_{exp} = 1,05$
$Sd_2(y) = 0,66$	$Sd_2^2(y) = 0,43$	$F_{crítico} = 2,51$

- Teste às médias emparelhadas

Número de amostras	20
Graus de liberdade	19
t_{critico}	2,10
t_{exp}	7,95

Na Tabela 12 estão os resultados relativos ao teste das variâncias, sendo F_{exp} menor que F_{critico} conclui-se que as variâncias não são significativamente diferentes. Já as médias verificam-se significativamente diferentes, uma vez que a Hipótese nula é rejeitada.

Os valores de acidez total obtidos no FTIR não podem ser aceites pelo laboratório, uma vez que são significativamente diferentes dos obtidos pelo método clássico. A repetibilidade interna do método é de 0,30 g/L em ácido tartárico e as diferenças de resultados obtidas são superiores a esse valor. A recta da acidez total implementada terá de ser recalibrada, a introdução de mais pontos na calibração é uma das opções.

Na Tabela 13 encontram-se os resultados obtidos para o parâmetro açúcares redutores das amostras.

Tabela 13: Resultados de AR obtidos comparados com FTIR.

Amostra	Tipo de vinho	AR FTIR (g/L)	AR Clássica (g/L)	Diferença FTIR-Clássica
A	VB	4,23	2,02	2,21
B	VT	1,58	1,60	-0,02
C	VT	2,46	1,30	1,21
D	VT	5,83	4,40	1,48
E	VT	5,10	4,00	1,14
F	VT	11,8	9,10	2,70
G	VB	6,22	4,30	1,89
H	VT	4,75	6,30	-1,55
I	VT	3,98	2,70	1,28
J	VT	5,46	2,60	2,84
K	VT	3,96	3,00	0,92
L	VB	4,52	2,80	1,70
M	VT	5,97	2,80	3,20
N	VB	4,06	2,80	1,31
O	VR	4,86	3,10	1,75
P	VT	4,98	2,90	2,04
Q	VB	3,83	2,50	1,36
R	VB	6,34	3,80	2,54
S	VT	8,03	5,40	2,65
T	VT	3,92	3,40	0,50
Média		5,09	3,54	1,56
Desvio Padrão		2,11	1,78	1,09
Variância		4,47	3,16	1,20

Pela análise dos resultados verifica-se que a maior diferença verificada foi de 2,65 e a média das diferenças foi de 1,56 g/L entre os resultados obtido no FTIR e o método clássico. Na Tabela 14 estão os resultados obtidos para o teste das variâncias efectuado.

Tabela 14: Resultados do teste de verificação das variâncias para a determinação de AR no Bacchus.

$Sd_1(x) = 2,11$	$Sd_1^2(x) = 4,47$	$F_{exp} = 1,41$
$Sd_2(y) = 1,78$	$Sd_2^2(y) = 3,16$	$F_{critico} = 2,51$

- Teste às médias emparelhadas

Número de amostras	20
Graus de liberdade	19
t_{critico}	2,10
t_{exp}	2,51

Como F_{exp} é menor que F_{critico} então a Hipotese nula não é rejeitada, então as variâncias não são significativamente diferentes. No entanto, o mesmo não se verifica em relação às médias, uma vez que são estatisticamente diferentes. Os resultados obtidos no FTIR para o parâmetro de açúcares redutores em vinhos não podem ser considerados pelo laboratório como totalmente correctos, pois são significativamente diferentes dos obtidos pelo método clássico. O laboratório está ciente que estes resultados poderão ter sempre um desvio de aproximadamente 2 g/L e para resultados precisos é necessária a confirmação pelo método clássico. A recta dos açúcares no FTIR precisa de recalibração, introdução de mais amostras na recta implementada para diminuição dos desvios associados.

Apesar dos resultados dos parâmetros TAV, pH e AV serem considerados correctos quando obtidos no FTIR, precisam de confirmação constante, através do cruzamento de resultados com os métodos clássicos ³⁹, tal como é sugerido na bibliografia; para além das calibrações periódicas.

4.2. Calibração do FTIR

O objectivo é aperfeiçoar o comportamento do FTIR na determinação dos seis parâmetros de análise de espumantes, por forma a colocar o espectrómetro de FTIR a funcionar em rotina, permitindo obter resultados mais rapidamente. Para tal, foi necessário um ajuste de calibrações para cada parâmetro e a sua comparação com valores de referência obtidos por métodos clássicos de bancada.

A calibração corresponde à aplicação de um tratamento matemático com o intuito de identificar e relacionar a informação disponível, os valores espectrais da amostra, com um parâmetro físico-químico em estudo. Assim, é possível uma relação entre o conjunto de dados conhecidos, que são denominados por variáveis independentes, neste caso são os espectros de espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier e uma ou mais variáveis dependentes ¹¹.

Inicialmente, a análise da amostra é feita pela leitura do sinal desta na região do infravermelho, envolvendo um determinado número de valores de números de onda para amostras conhecidas, construindo assim uma matriz de dados ³⁷.

Podem-se considerar dois métodos de validação do modelo: a validação externa, onde são introduzidos novos dados para testar a capacidade de prever do modelo, e a validação interna, onde um conjunto de dados originais da calibração é também utilizado como conjunto de validação. Foi utilizada validação externa para calibração dos espumantes.

O espumante é um vinho que resulta de uma segunda fermentação alcoólica em garrafa, sendo produzido CO_2 , conferindo gás ao espumante. Para análise de espumantes no FTIR, um passo importante é a desgasificação da amostra, uma vez que a ligação $\text{C}=\text{O}$ interfere na absorção das restantes bandas dos outros parâmetros.

Na Tabela 15 é apresentada a constituição dos produtos implementados, bem como o número de amostras utilizadas para ajuste de cada uma das curvas de calibração.

Foram implementadas duas rectas distintas para os espumantes: uma para espumante bruto e outra para espumante meio-seco. Esta diferença deve-se essencialmente ao parâmetro dos açúcares. A concentração de açúcares nos espumantes bruto pode chegar até 10g/L enquanto que em espumante meio-seco ronda os 27-40 g/L, o que iria originar uma grande dispersão de pontos se só houvesse uma recta para os dois casos. Assim ficam mais ajustadas a cada caso ³⁸.

Tabela 15: Constituição dos produtos de calibração do Bacchus.

Produto	Parâmetro	Curva de calibração	Nº de amostras de referência
Espumantes Degorgement Bruto	TAV	TAV 5A	17
	MV	MV 8A	19
	pH	pH 6A	19
	AR	SUCRES TTX	24
	AT	AT 6A	16
	AV	AV 4A	22
Espumantes Degorgement Meio-seco	TAV	TAV 4B	12
	MV	MV 8A	17
	pH	pH 4A	17
	AR	SUCRES TTX	16
	AT	AT 7A	11
	AV	AV CASTEL	17

Cada produto é constituído pelos parâmetros TAV, MV, pH, AR, AT e AV. Para cada um dos quais foi verificado qual a recta que melhor se ajustava aos resultados obtidos pelos métodos clássicos. As rectas seleccionadas são apresentadas na Tabela 16. O produto espumantes bruto foi calibrado com 24 amostras de referência, tendo sido eliminados alguns pontos devido à diferença máxima aceite entre os dois resultados, já previamente definido. Para o produto espumantes meio seco foram utilizadas 19 amostras para calibração.

A escolha da curva visa o melhor ajuste com os valores de referência, ou seja, a curva com maior coeficiente de correlação e declive o mais próximo da unidade quanto possível. A título de exemplo, para o caso do parâmetro TAV, o FTIR contém 12 rectas de calibração pré-definidas e a selecção da curva é feita com base nos dois factores já referidos.

Isto porque o coeficiente de correlação linear relaciona a intensidade da associação linear existente entre as variáveis e o desvio padrão residual é um parâmetro estatístico usado para descrever o desvio dos pontos formado em torno de uma função linear, sendo assim uma estimativa da precisão variável dependente que está a ser medida ¹¹.

Assim, as equações que constituem os produtos “espumante bruto” e “espumante meio-seco” foram escolhidas com base no critério de a recta possuir o maior coeficiente de correlação possível e o menor desvio residual. Foram ainda tidas em conta o número de amostras de calibração que restavam quando eliminadas as que não respeitarem o critério de aceitação pré-estabelecido.

O critério de aceitação dos valores dados pelo equipamento quando comparados com os valores de referência é definido para cada parâmetro, variando com a repetibilidade de cada método clássico.

Na Tabela 16 encontram-se as equações implementadas no produto “espumante bruto” e “espumante meio-seco”, para os parâmetros TAV, MV, pH, AR, AT e AV, bem como os coeficientes de correlação.

Tabela 16: Equações escolhidas e coeficientes de correlação dos espumantes bruto e meio-seco.

Produto	Parâmetro	Recta nova	Coeficiente de correlação
Espumante bruto	TAV	$0,9193X + 0,5243$	0,9073
	MV	$0,9395X + 0,0607$	0,9060
	pH	$1,1784X - 0,4074$	0,9581
	AR	$0,6162X - 0,2152$	0,9808
	AT	$1,3299X + 0,2028$	0,9556
	AV	$1,0563X - 0,1102$	0,9304
Espumante meio-seco	TAV	$0,9130X - 0,2802$	0,9213
	MV	$0,9395X + 0,0607$	0,8985
	pH	$1,3541X - 0,9884$	0,8377
	AR	$0,6162X - 0,2152$	0,9531
	AT	$0,9608X + 2,3476$	0,9249
	AV	$0,9177X - 0,045$	0,9304

A Figura 9 exemplifica isso mesmo, a título de exemplo. Representa o parâmetro teor alcoólico do produto espumante bruto. Aquando da calibração para esta recta, são seleccionadas todas as rectas existentes no programa de origem para o teor alcoólico, obtidas a partir de amostras variadas. O objectivo da calibração é verificar qual dessas rectas se ajusta mais às amostras analisadas no laboratório. Todos as rectas existentes são comparadas com os valores obtidos pelo método clássico. O programa fornece uma tabela com a comparação dos valores obtidos no FTIR e dos valores de referência introduzidas e a respectiva diferença entre os dois. A tabela gerada encontra-se na Figura 9. Os números -1 existentes correspondem aos valores eliminados, cuja diferença entre os dois métodos era muito significativa e contribuía para que a nova recta tivesse um declive muito diferente da unidade.

	Inst	Ref	Inst(*)	Dif
107638	18,72	12,20	12,04	0,16
107640	17,86	11,80	11,69	0,11
107689	17,95	11,70	11,72	-0,02
107694	-1	-1	-1	-1
107699	-1	-1	-1	-1
107868	18,59	12,10	11,99	0,11
107869	-1	-1	-1	-1
107546	-1	-1	-1	-1
107547	18,91	12,25	12,13	0,12
108067	-1	-1	-1	-1
110080	18,61	12,00	12,00	0,00
110082	18,80	12,00	12,08	-0,08
110084	19,20	12,20	12,24	-0,04
110086	19,45	12,30	12,35	-0,05
110161	19,08	12,20	12,20	0,00
110065	18,62	12,00	12,00	0,00
110184	18,14	11,70	11,80	-0,10
110244	18,31	11,80	11,88	-0,08
110293	19,42	12,30	12,34	-0,04
110302	18,03	11,57	11,76	-0,19
110232	-1	-1	-1	-1
110414	18,92	12,10	12,13	-0,03
107542	18,23	11,97	11,84	0,13
107543	-1	-1	-1	-1

Figura.9: Tabela de resultados fornecida pelo programa: Inst – valores instrumentais, Ref – valores de referência, Inst (*) – valores instrumentais depois da correcção, Dif – diferença entre os valores de referência e os instrumentais corrigidos.

É assim seleccionada a recta que possui maior coeficiente de correlação e declive o mais próximo possível do valor 1.

Após a selecção, o sistema fornece um gráfico, Figura 10, onde compara a recta anterior com a nova, já com os pontos eliminados. Na Figura 10, no eixo das abcissas encontram-se os valores instrumentais, os valores que o programa gera, e o eixo das ordenadas corresponde aos valores obtidos pelos métodos clássicos, são por isso os valores de referência introduzidos no FTIR. A recta da direita representa os valores que o sistema produz antes da calibração e a recta

da esquerda representa os valores que o sistema produz com a nova recta implementada, os valores já corrigidos. Antes da calibração o programa originava resultados entre 17 e 18% para as amostras em análise; e com a nova recta, ajustada, obtêm-se resultados entre 11,5 e 12,5%, os verdadeiros valores das amostras.

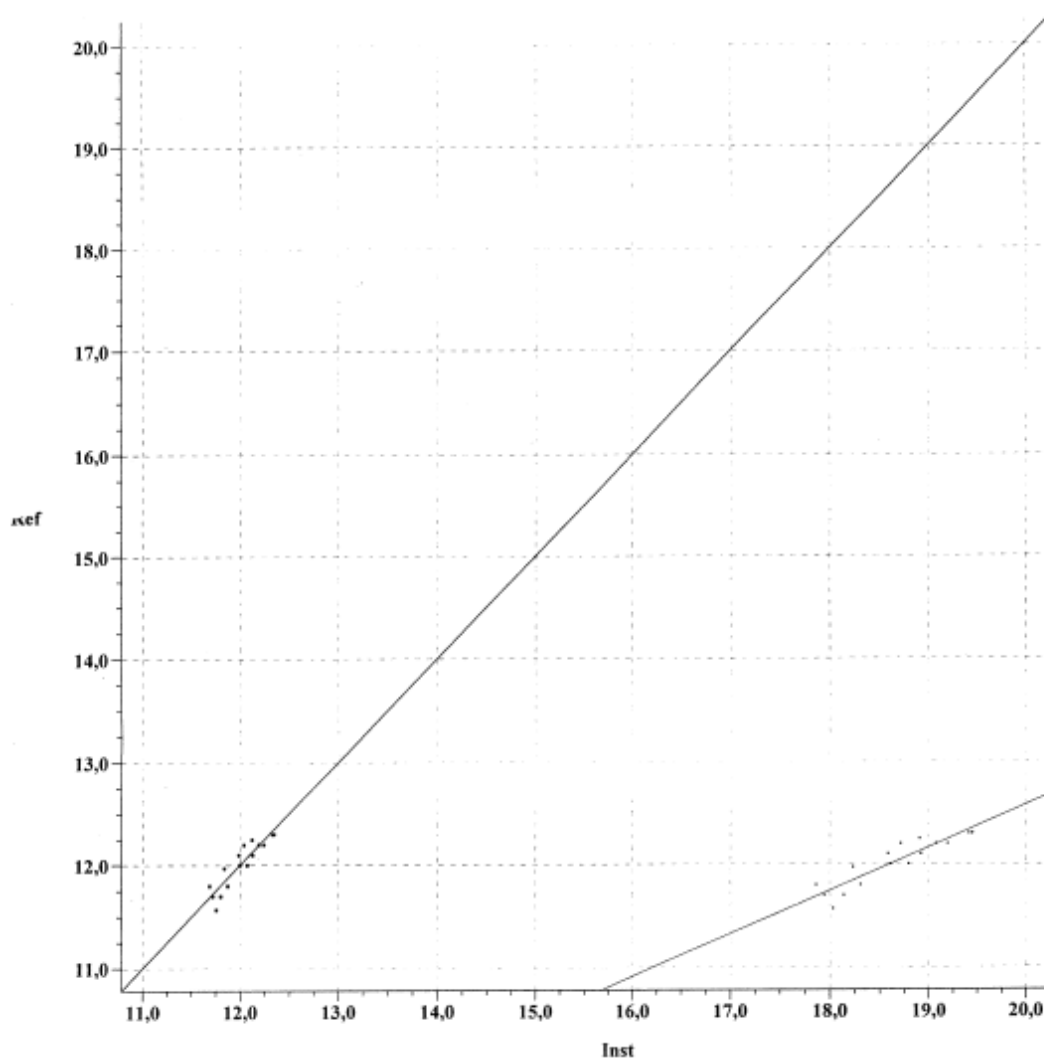


Figura 10: Representação, fornecida pelo equipamento, da recta anterior TAV para espumante bruto e a nova implementada.

Na Tabela 17 e 18 encontram-se os valores obtidos no FTIR com as novas rectas já implementadas e os resultados dos métodos clássicos, para dois espumantes bruto e para dois meio-seco. As análises foram feitas em triplicado para cada um dos parâmetros e é apresentada a média e o desvio padrão respectivo.

Tabela 17: Valores de FTIR e de métodos clássicos obtidos para dois espumantes bruto com as respectivas médias e desvios padrão.

Espumante	TAV FTIR	TAV Clássica	AV FTIR	AV Clássica	AT FTIR	AT Clássica	pH FTIR	pH Clássica	MV FTIR	MV Clássica	AR FTIR	AR Clássica
Bruto A	12,08	12,01	0,57	0,60	4,69	4,13	3,33	3,33	0,9922	0,9918	6,60	6,22
	12,10	12,01	0,57	0,58	4,70	4,50	3,32	3,33	0,9922	0,9918	6,70	6,25
	12,11	12,01	0,61	0,58	4,80	4,50	3,32	3,35	0,9924	0,9918	6,90	6,25
Bruto B	12,71	12,69	0,57	0,58	5,69	5,25	3,15	3,19	0,9914	0,9914	7,40	7,57
	12,70	12,69	0,56	0,58	5,89	5,25	3,18	3,19	0,9916	0,9914	7,90	7,50
	12,68	12,69	0,56	0,57	5,91	5,25	3,19	3,18	0,9914	0,9914	8,10	7,44

Tabela 18: Valores de FTIR e de métodos clássicos obtidos para dois espumantes meio-seco com as respectivas médias e desvios padrão.

Espumante	TAV FTIR	TAV Clássica	AV FTIR	AV Clássica	AT FTIR	AT Clássica	pH FTIR	pH Clássica	MV FTIR	MV Clássica	AR FTIR	AR Clássica
Meio-seco A	12,24	12,20	0,56	0,58	5,50	5,25	3,08	3,07	1,0025	1,0024	31,40	30,60
	12,25	12,20	0,55	0,58	5,30	5,25	3,08	3,09	1,0027	1,0024	31,30	30,43
	12,24	12,20	0,58	0,58	5,35	5,25	3,09	3,09	1,0027	1,0024	31,40	30,30
Meio-seco B	11,96	12,00	0,55	0,54	4,73	4,50	3,25	3,20	1,0053	1,0056	38,80	38,46
	11,96	12,00	0,57	0,54	4,70	4,50	3,25	3,20	1,0055	1,0056	38,90	38,20
	11,95	12,00	0,57	0,60	4,62	4,88	3,24	3,22	1,0056	1,0056	39,20	37,59

Com o objectivo de determinar se os valores obtidos no FTIR para as novas rectas de espumantes, quer bruto quer meio-seco, são significativamente diferentes dos obtidos pelos métodos clássicos, foi efectuada o teste estatístico t , para cada amostra analisada em cada uma das rectas, e para cada um dos parâmetros. As Tabelas 19 e 20 contêm esses resultados.

Tabela 19: Teste das médias emparelhadas aos resultados obtidos pela recta de espumante bruto.

	Espumante	TAV	AV	AT	pH	MV	AR
t_{exp}	Bruto A	6,06	0,77	2,77	2,45	1,87	5,61
	Bruto B	0,87	2,44	8,37	1,55	1,73	1,41
$t_{\text{crítico}}$	2,78						

Tabela 20: Teste das médias emparelhadas aos resultados obtidos pela recta de espumante meio-seco.

	Espumante	TAV	AV	AT	pH	MV	AR
t_{exp}	Meio-seco A	2,30	1,73	2,25	0,00	0,03	9,97
	Meio-seco B	2,31	0,38	0,38	2,09	0,87	3,10
$t_{\text{crítico}}$	2,78						

Analisando os resultados obtidos para a recta dos espumantes bruto conclui-se que para os parâmetros AV, pH e MV os resultados obtidos no FTIR e pelos métodos clássicos não diferem significativamente, uma vez que o valor de t_{exp} é menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$. Assim, os valores obtidos por FTIR para estes parâmetros podem ser aceites como correctos pelo laboratório. Já os parâmetros AR, AT e TAV necessitam de mais amostras analisadas e valores de referência introduzidos para um melhor ajuste das rectas às amostras analisadas no laboratório.

Da análise dos resultados para a recta de espumantes meio-seco verifica-se que apenas o parâmetro dos açúcares redutores analisado pelo FTIR é significativamente diferente dos resultados obtidos pelo método clássico, pois o valor de t_{exp} é maior que o valor de $t_{\text{crítico}}$. Os resultados dos restantes parâmetros não são estatisticamente diferentes quando obtidos por métodos clássicos ou por FTIR. Pode-se concluir portanto que apenas o parâmetro açúcares redutores necessita de nova calibração ou implementação de mais amostras na recta de calibração para diminuir o erro associado, os restantes podem ser analisados rotineiramente pelo FTIR.

4.3. Método azoto assimilável

A concentração de azoto assimilável nos mostos é muito importante para que a fermentação alcoólica ocorra normalmente e sem paragens.

O método de Sorensen, ou método do formaldeído, é um método simples e rápido para determinar a quantidade de azoto assimilável presente em mostos.

Este método foi estudado com vista a ser adoptado pelo laboratório, tendo sido realizados ensaios para verificar a sua repetibilidade e precisão. Inicialmente foram realizados ensaios em soluções de concentração de azoto conhecida e rigorosa. Foi usado o reagente oxalato de amónio para obter as diferentes concentrações de amónio nas soluções. Como o intervalo de azoto nos mostos se encontra entre os 100 e 200 mg/L, foram escolhidos valores de concentração de amónio entre 50 e 300 mg/L, valores abaixo e acima do intervalo referido. Foram então realizados 10 ensaios para cada uma das concentrações e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados obtidos nas soluções de concentração conhecida feitas a partir de oxalato de amónio com o titulante a 0,1M.

		Ensaio										Média (mg/L)	Desvio Padrão
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º		
C=50 mg/L	Volume gasto (mL)	1,40	1,50	1,40	1,80	1,80	1,90	1,70	1,90	2,00	1,90		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	39,2	42,0	39,2	50,4	50,4	53,2	47,6	53,2	56,0	53,2	48,4	6,20
C=100 mg/L	Volume gasto (mL)	2,40	2,60	3,00	2,60	2,60	2,70	3,00	3,20	3,20	2,80		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	67,2	72,8	84,0	72,8	72,8	75,6	84,0	89,6	89,6	78,4	78,7	7,75
C=150 mg/L	Volume gasto (mL)	4,50	4,10	4,00	4,60	4,30	4,50	4,50	4,60	4,30	4,40		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	126	115	112	129	120	126	126	129	120	123	123	5,43
C=200 mg/L	Volume gasto (mL)	6,10	6,30	6,00	6,10	6,30	6,30	6,40	6,20	6,10	6,10		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	171	176	168	179	176	176	179	174	171	171	173	3,42
C=300 mg/L	Volume gasto (mL)	8,90	8,70	8,70	8,70	9,00	8,50	9,2	8,90	8,80	9,00		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	249	244	244	244	252	238	258	249	246	252	248	5,34

Pela análise da Tabela 21, verifica-se que apenas para a concentração de 50 mg/L se obtêm resultados satisfatórios, pois a média dos resultados obtidos aproxima-se bastante do valor real da concentração. Para as concentrações de 100, 150, 200 e 300 mg/L os resultados estão longe do valor real de concentração. Apesar de estes possuírem valores elevados de desvios padrão, mesmo assim o resultado real não se encontra nesse intervalo. Para estas concentrações houve perdas de amónio, uma vez que todas as médias de concentrações se encontram abaixo do esperado, não se aplicando portanto qualquer tratamento estatístico.

Devido aos resultados obtidos, optou-se por realizar os ensaios com o titulante com menor concentração, ou seja, em vez de NaOH 0,1M utilizou-se NaOH 0,05M, para ser gasto mais volume e consequentemente os erros associados serem menores. Os resultados obtidos para estes ensaios encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22: Resultados obtidos nas soluções de concentração conhecida feitas a partir de oxalato de amônio com o titulante a 0,05M.

		Ensaio					Média (mg/L)	Desvio padrão
		1º	2º	3º	4º	5º		
C=100mg/L	Volume gasto (mL)	6,80	6,90	7,10	7,20	6,90		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	95,2	96,6	99,4	101	96,6	97,7	2,06
C=150mg/L	Volume gasto (mL)	9,50	9,70	9,50	9,70	9,70		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	133	136	133	136	136	135	1,37
C=200mg/L	Volume gasto (mL)	14,2	14,3	14,8	14,3	14,4		
	[NH ₄ ⁺](mg/L)	171	172	178	172	173	173	2,50
C=300mg/L	Volume gasto (mL)	20,4	21,3	20,7	21,3	21,0		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	246	257	249	257	253	252	4,20

Os resultados obtidos não demonstram grandes melhorias, uma vez que a diferença do valor real de concentração de amônio e da média dos valores obtidos continua a ter diferenças significativas. Uma vez que o oxalato de amônio não apresenta muita solubilidade em água, pensa-se que tenha havido perdas de azoto.

Assim, optou-se por trocar o sal em uso e experimentou-se o cloreto de amônio, uma vez que a sua solubilidade em água é elevada. Na tabela 23 são apresentados os resultados obtidos para as soluções de concentração conhecida de amônio feitas a partir de acetato de amônio.

Tabela 23: Resultados obtidos nas soluções de concentração conhecida feitas a partir de cloreto de amônio com o titulante a 0,05M.

		Ensaio					Média (mg/L)	Desvio Padrão
		1º	2º	3º	4º	5º		
C=50mg/L	Volume gasto (mL)	4,40	4,80	4,80	4,40	4,60		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	49,3	53,8	53,8	49,3	51,5	51,5	2,24
C=100mg/L	Volume gasto (mL)	8,80	9,20	9,00	9,00	8,90		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	98,6	103	101	101	99,7	101	1,66
C=150mg/L	Volume gasto (mL)	13,0	13,0	13,4	12,8	13,0		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	146	146	151	143	146	146	2,45
C=200mg/L	Volume gasto (mL)	17,8	17,2	17,5	17,2	17,3		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	199	193	196	193	194	195	2,55
C=300mg/L	Volume gasto (mL)	25,4	25,4	25,8	25,4	25,2		
	[NH ₄ ⁺] (mg/L)	284	285	289	285	282	285	2,45

Os resultados obtidos para as soluções de concentração conhecidas feitas a partir de cloreto de amônio são bastante melhores, pois os resultados das médias das concentrações obtidas são os que mais se aproximam do valor real da concentração de todos os ensaios realizados. Aplicou-se um teste estatístico às médias das diferenças dos resultados obtidos para verificar se estes são estatisticamente válidos.

- Teste t emparelhado

Média das diferenças	4,41
Desvio padrão das diferenças	6,60
t_{exp}	1,50
Graus de liberdade	4
$t_{\text{crítico}}$	2,78

Pela análise do teste t emparelhado, verifica-se que t_{exp} apresenta um valor menor que $t_{\text{crítico}}$, assim a hipótese nula não é rejeitada e por isso as diferenças entre os valores obtidos e as concentrações reais não são significativamente diferentes, concluindo-se portanto que os resultados obtidos para o padrão cloreto de amônio são satisfatórios.

Ainda assim, devido ao valor de 300 mg/L apresentar um desvio maior que nas restantes concentrações, foi feito um gráfico com os resultados obtidos e comparação com os valores de referência. O gráfico obtido encontra-se na Figura 11.

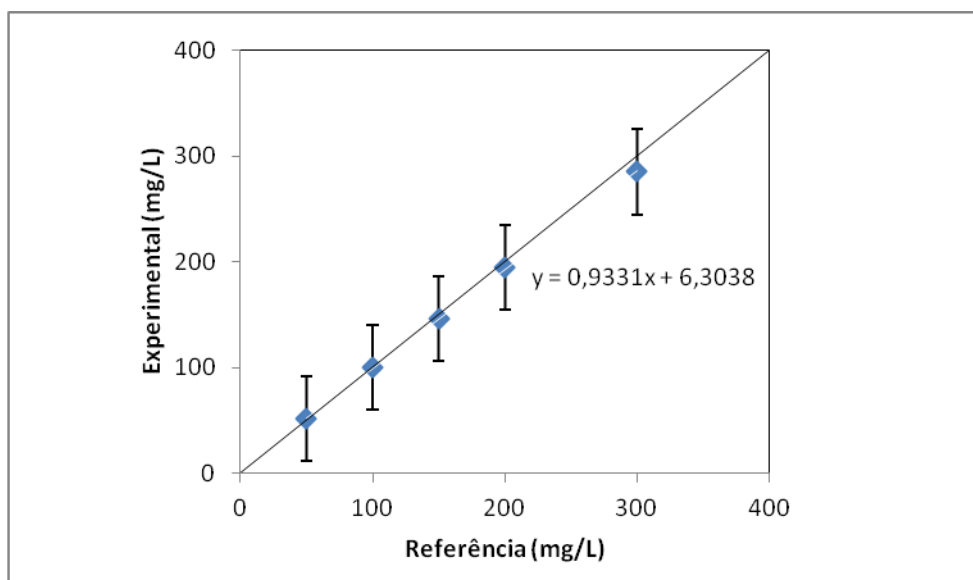


Figura 11: Resultados obtidos para o padrão cloreto de amônio com as respectivas barras de erro padrão.

Na Figura 11 estão representados graficamente os resultados obtidos, cujo declive da recta é 0,9331. No gráfico encontra-se ainda a recta de declive 1, obtida com os valores de referência, para comparação com os resultados experimentais. Foi realizado um teste estatístico para verificar se o declive obtido para os resultados experimentais difere significativamente da unidade.

- Teste t

t_{exp}	1,06
$t_{\text{crítico}}$	2,78

Como t_{exp} é menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$ tabelado conclui-se que os declives não são significativamente diferentes.

Assim, pode-se concluir que o método de Sorensen é viável para a determinação da concentração de azoto facilmente assimilável em mostos, na gama de 50 a 300 mg/L NH_4^+ , tendo sido obtidos resultados correctos, tal como já tinha sido referido em alguns estudos ²⁸. Este método foi então implementado no laboratório, sendo incluindo nos métodos internos do mesmo.

O próximo passo foi a implementação destes resultados obtidos na recta de mostos já implementada no FTIR. O objectivo era permitir a análise de mais este parâmetro quando amostras de mostos fossem analisadas no FTIR.

Foram então realizados 13 ensaios em mostos para determinação da concentração de azoto facilmente assimilável pelo método de Sorensen e processados também no FTIR, com intuito de ajustar a recta às características dos mostos analisados no laboratório.

Pela análise dos resultados processados no programa verificou-se que existiam grandes diferenças de valores, na ordem de 30 e 40 mg/L de azoto entre o método clássico e o FTIR, após ajuste da recta. Na impossibilidade da realização de mais ensaios, devido a não haver disponibilidade de mostos, não foi possível introduzir mais amostras na recta de calibração, para que o erro associado a cada valor fosse menor. Assim, a calibração do FTIR para o parâmetro azoto assimilável em mostos não foi efectuada com sucesso. É necessário realizar uma nova calibração para este parâmetro.

5. Conclusão

Os métodos de análise de mostos para controlo de maturação são ferramentas fiáveis e indispensáveis para controlar a evolução da uva na vinha e prever o resultado do perfil químico do vinho a produzir.

Neste estudo os parâmetros analíticos determinados ao longo das amostragens de controlo de maturação – pH, acidez total, teor alcoólico provável - ao nível do mosto, mostram resultados credíveis quanto à tentativa de previsão destas características químicas após a fermentação.

As análises de controlo analítico de rotina em vinhos são realizadas por FTIR. No entanto este equipamento necessita de calibrações específicas para cada parâmetro em análise. Depois de implementadas as rectas de calibração, estas necessitam de verificações periódicas para assegurar a fiabilidade dos resultados. A verificação efectuada aos parâmetros teor alcoólico, acidez volátil e pH revelou que estes estão de acordo e não apresentam diferenças significativas quando comparados com os valores de referência. Os parâmetros acidez total e açúcares redutores mostraram ser estatisticamente diferentes dos obtidos pelos métodos de referência e necessitam por isso de uma recalibração ou inclusão de mais amostras nas rectas de calibração para diminuição dos erros associados. Conclui-se, assim, que não se podem usar as calibrações de fábrica, sendo crucial efectuar calibrações analíticas específicas adaptadas às matrizes em estudo.

A implementação de rectas de calibração no FTIR para a análise de espumantes implicou a separação entre espumantes bruto e meio-seco. Os parâmetros implementados foram TAV, AV, AT, pH, MV e AR para cada tipo de espumante. A escolha da recta recai sobre a que possuir maior coeficiente de correlação e com declive o mais próximo possível da unidade. Após a selecção das rectas para cada um dos parâmetros, foram realizados ensaios de comparação entre os resultados de FTIR obtidos e os valores dos métodos clássicos. Para a recta do espumante bruto conclui-se que para os parâmetros AV, MV e pH as rectas estão ajustadas pois as diferenças registadas não foram significativas, já os parâmetros TAV, AT e AR necessitam de mais amostras para um melhor ajuste das rectas.

Para o espumante meio-seco, todos os parâmetros, excepto o AR, encontram-se devidamente ajustados, dando origem a resultados que não diferem significativamente dos métodos clássicos. Para o parâmetro AR é preciso uma recalibração da recta e introdução de mais valores de referência.

O método de Sorensen, para quantificação de azoto facilmente assimilável, ou seja, o teor em catião amónio que as leveduras utilizam para uma fermentação saudável, foi implementado no laboratório com sucesso. Este é mais parâmetro para a caracterização físico-química dos mostos. Não foi possível a sua inclusão na análise de mostos pelo FTIR, uma vez que é necessário a realização de mais ensaios.

6. Bibliografia

1. Regulamento (CE) N.º 479/2008 do Conselho de 29 de Abril de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*.
2. Glampedaki, P. H.; Paraskevopoulou, A.; Pegiadou-Koemtzopoulou, S. (2010). Surface tension of still wines in relation to some of their constituents: A simple determination of ethanol content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 373-381.
3. www.infovini.com (acedido a 8 Dezembro 2010).
4. Jackson, R. S. (2008). *Wine Science, Principles and Applications*. 3rd ed.; Elsevier Inc.
5. Ribéreau-Gayon, P. G.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2006) *Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd.
6. Mato, I. S.-L.; Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38, 1175–1188.
7. Ribéreau-Gayon, J. E. P.; Sudraud, P.; Ribéreau-Gayon, P. (1982). *Sciences et Techniques du Vin. Tome 1 - Analyse et Contrôle des Vins*. Dunod: Paris.
8. Regulamento (CEE) N.º 2676/90 – Métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho (1990). *Jornal Oficial da União Europeia*.
9. Versari, A. P.; Scazzina, F.; Del Rio, D. (2010). Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Control*, 21, 786–789.
11. Moreira, J. L. M.; Barros, P.; Potencialidades da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) na análise de vinhos. *Instituto da Vinha e do Vinho, Laboratório Vitivinícola*.
12. Nieuwoudt, H. H. P.; Bauer, F. F.; Nel, D. G.; Prior, B. A. (2006). Rapid screening of the fermentation profiles of wine yeasts by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 248-256.
13. www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-022510-133750 (acedido a 25 de Novembro de 2010).
14. Stuart, B. G., McIntyre, P. (1996). *Modern Infrared Spectroscopy*. John Wiley & Sons: New York.
15. Bauer, R. B., Kossmann, J.; Koch, K. R.; Esbensen, K.H. (2008). FTIR Spectroscopy for Grape and Wine Analysis. *Analytical Chemistry*, 80, 1371-1379.
16. Skoog, D. A. (1996). *Fundamentals of analytical chemistry*. 4th ed.; Saunders College Publishing.
17. Bauer, R. N.; Bauer, F. F.; Kossmann, J.; Koch, K. R.; Esbensen, K. H. (2008). FTIR Spectroscopy for Grape and Wine Analysis. *Analytical Chemistry*, 1371-1379.

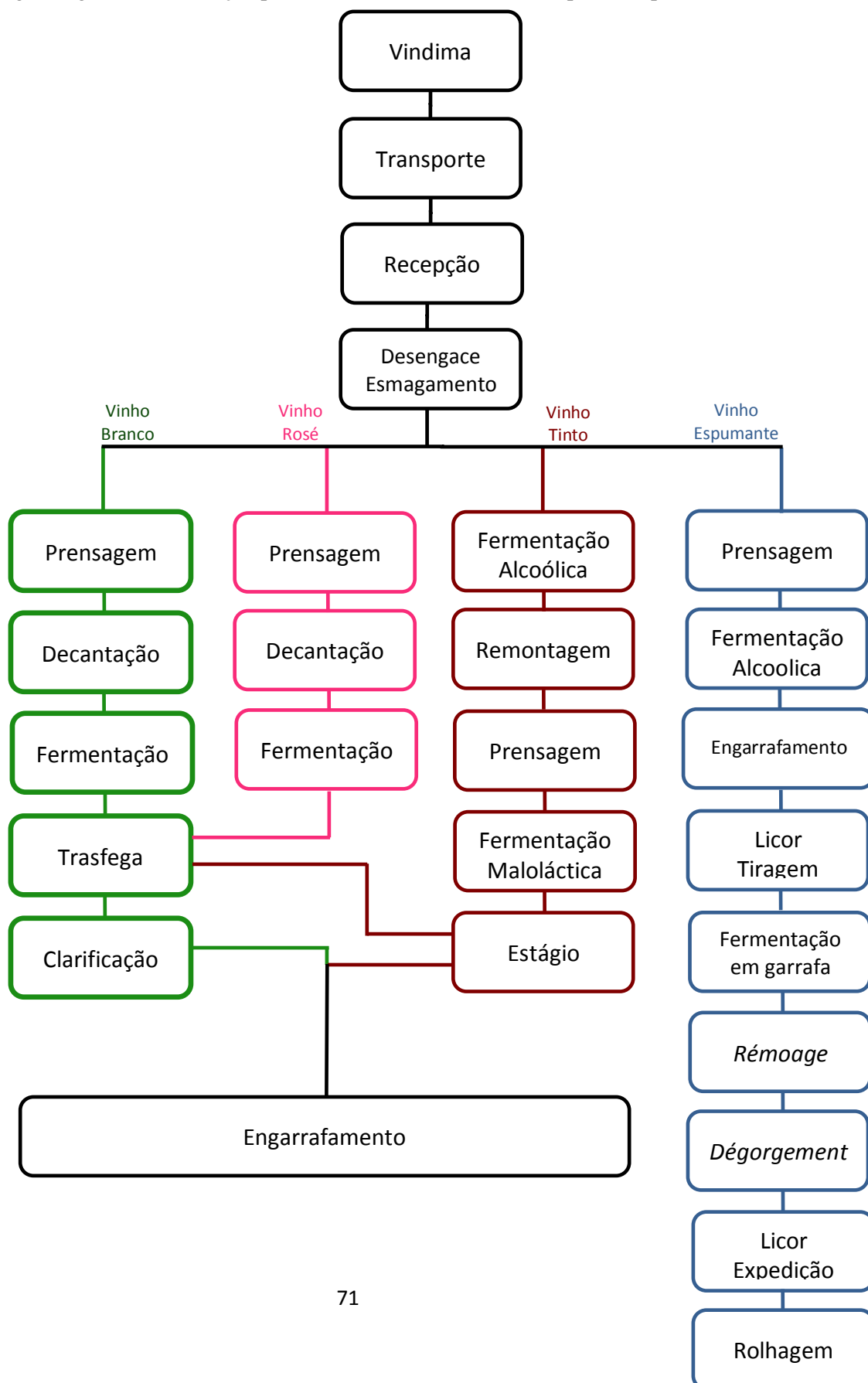
18. Castro, M. D. L. (2005). Analytical methods in wineries: Is it time to change? *Food Reviews International*, 21, 231-265.
19. www.microdom.net (acedido a 9 de Janeiro 2011).
20. Curvelo-Garcia, A. S. (1988). *Controlo de qualidade nos vinhos. Química enológica. Métodos analíticos*. Lisboa.
21. <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/home.html> (acedido a 25 Setembro 2011).
22. Moreno-Arribas, M. V. P. (2009). *Wine chemistry and biochemistry*. Springer: Madrid.
23. Ribéreau-Gayon, P. D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd, Vol. 1.
24. Filipe-Ribeiro, L. M.-F. (2007). Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry*, 100, 1272–1277.
25. <http://vsites.unb.br> (acedido a 30 de Janeiro 2011).
26. Bely, M. R.; Durbourdieu, D. (2003). Influence of Assimilable Nitrogen on Volatile Acidity Production by *Saccharomyces cerevisiae* during High Sugar Fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 507-512.
27. Taillandier, P. P.; Fuster, A.; Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology*, 24, 95-100.
28. Gump, B. H. Z.; Fugelsang, K. C. (2001). Prediction of prefermentation nutritional status of grape juice - The formol method. *Food Microbiology Protocols*, 14, 283-304.
29. Genfa, Z. D. (1989). Fluorometric Measurement of Aqueous Ammonium Ion in a Flow Injection System. *Analytical Chemistry*, 61, 408-412.
30. Krom, M. D. (1980). Spectrophotometric A Study of a Determination of Ammonia: Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and dichloroisocyanurate. *The Analyst*, 105, 305-316.
31. Gonzalez-Rodriguez, J. P.-J.; Luque de Castro, M. D. (2002). Flow injection determination of readily assimilable nitrogen compounds during vinification, 127, 420-423.
32. ISO - Sistemas de gestão da qualidade: Fundamentos e vocabulário. Versão Portuguesa (IPQ 2001) da ISO 9000:2000. *International Organization for Standardization, ISO 9000:2000*. Genève.
33. Filipe, E., Validação dos Métodos de Calibração nos Laboratórios Nacionais de Metrologia. *Instituto Português da Qualidade*.
34. Wood, R. (1999). How to validate analytical methods. *Analytical Chemistry*, 18, 624-632.

35. *Guia Relacre 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise em química*. Ed. Relacre (2000).
36. Miller, J. N. M. (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 4th ed.; Prentice Hall: Harlow.
37. Moreira, J. L.; Marcos, A. M.; Barros, P. (2002). Análise de vinhos portugueses por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 17, 27-33.
38. Patz, C.-D.; Blieke, A.; Dietrich, H. (2004). Application of FT-MIR spectroscopy in wine analysis, *Analytica Chimica Acta*, 513, 81-89.
39. Ferreira, M. L.; Costa, M.; Ribeiro, N.; Simões, T.; Barros, P. (2009). Quality control in FTIR wine analysis – Acceptance of analytical results, *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 24, 47-53.

7. Anexos

Anexo I

Diagrama geral de vinificação para vinho branco, rosé, tinto e espumante pelo método clássico.



Anexo II

Tabela de correcção da massa volúmica em função da temperatura.

TABLEAU A : Exemple : Lecture 1080 à 11°C = 1077.56 - Lecture 1090 à 26°C = 1092.85

T°C	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140
10	1.27	1.47	1.65	1.83	1.99	2.17	2.34	2.52	2.68	2.85	2.99	3.16	3.29	3.44	3.58
11	1.21	1.37	1.53	1.69	1.84	2.00	2.16	2.29	2.44	2.59	2.73	2.86	2.99	3.12	3.24
12	1.10	1.26	1.40	1.53	1.67	1.81	1.95	2.08	2.21	2.34	2.47	2.58	2.70	2.82	2.92
13	1.03	1.16	1.28	1.40	1.52	1.62	1.74	1.85	1.96	2.07	2.17	2.28	2.38	2.48	2.59
14	0.92	1.03	1.14	1.24	1.34	1.44	1.54	1.64	1.73	1.82	1.92	2.00	2.08	2.17	2.25
15	0.77	0.87	0.96	1.04	1.13	1.21	1.29	1.37	1.45	1.53	1.60	1.68	1.75	1.82	1.89
16	0.65	0.72	0.79	0.86	0.93	1.00	1.06	1.12	1.19	1.25	1.31	1.37	1.43	1.49	1.54
17	0.50	0.56	0.61	0.66	0.72	0.76	0.82	0.86	0.91	0.96	1.00	1.05	1.09	1.14	1.18
18	0.35	0.39	0.43	0.47	0.49	0.53	0.56	0.59	0.63	0.65	0.69	0.72	0.74	0.77	0.80
19	0.19	0.21	0.23	0.25	0.27	0.28	0.30	0.31	0.33	0.35	0.36	0.38	0.39	0.41	0.42
21	0.19	0.21	0.23	0.25	0.27	0.28	0.30	0.31	0.33	0.35	0.36	0.38	0.39	0.41	0.42
22	0.39	0.42	0.45	0.49	0.52	0.55	0.58	0.61	0.64	0.67	0.70	0.73	0.76	0.78	0.81
23	0.61	0.66	0.71	0.76	0.80	0.85	0.90	0.95	0.99	1.04	1.08	1.12	1.16	1.21	1.25
24	0.85	0.91	0.97	1.03	1.09	1.15	1.19	1.25	1.31	1.37	1.43	1.48	1.54	1.60	1.65
25	1.08	1.15	1.23	1.30	1.37	1.44	1.52	1.59	1.67	1.74	1.81	1.88	1.95	2.02	2.09
26	1.30	1.40	1.49	1.58	1.67	1.76	1.84	1.93	2.02	2.10	2.18	2.25	2.33	2.41	2.49
27	1.57	1.68	1.77	1.88	1.96	2.07	2.16	2.26	2.36	2.46	2.56	2.65	2.74	2.83	2.91
28	1.82	1.93	2.05	2.16	2.29	2.39	2.51	2.63	2.74	2.85	2.96	3.06	3.16	3.28	3.38
29	2.11	2.23	2.36	2.49	2.62	2.74	2.86	2.97	3.09	3.22	3.34	3.46	3.57	3.69	3.80
30	2.38	2.52	2.67	2.80	2.93	3.06	3.21	3.35	3.50	3.63	3.77	3.91	4.02	4.15	4.28

Anexo III

Tabela de cálculo do teor alcoólico provável.

TABLEAU DE CORRESPONDANCES									
Rendement alcoolique									
M.V.	T.S.	1.6	1.65	1.683	1.7	1.75	1.8	I.R.	BAUME BRIX
1036	74.74	4.67	4.53	4.44	4.40	4.27	4.15	1.3467	5.3 9.5
1038	79.87	4.99	4.84	4.75	4.70	4.56	4.44	1.3475	5.6 10.0
1040	85.00	5.31	5.15	5.05	5.00	4.86	4.72	1.3482	5.8 10.5
1042	90.13	5.63	5.46	4.34	5.30	5.15	5.00	1.3490	6.0 10.9
1044	95.26	5.95	5.77	5.66	5.60	5.44	5.29	1.3497	6.3 11.4
1046	100.39	6.27	6.08	5.96	5.90	5.74	5.58	1.3505	6.6 11.9
1048	105.52	6.59	6.39	6.26	6.21	6.03	5.86	1.3512	6.9 12.4
1050	110.65	6.91	6.71	6.56	6.51	6.32	6.15	1.3520	7.1 12.9
1052	115.78	7.24	7.02	6.88	6.81	6.62	6.43	1.3527	7.4 13.3
1054	120.91	7.56	7.33	7.18	7.11	6.91	6.72	1.3535	7.7 13.8
1056	126.03	7.88	7.64	7.48	7.41	7.20	7.00	1.3542	8.0 14.3
1058	131.16	8.2	7.95	7.79	7.72	7.49	7.29	1.3550	8.2 14.7
1060	136.29	8.52	8.26	8.10	8.02	7.79	7.57	1.3557	8.4 15.2
1062	141.42	8.84	8.57	8.40	8.32	8.08	7.86	1.3565	8.7 15.7
1064	146.55	9.16	8.88	8.70	8.62	8.37	8.14	1.3572	8.9 16.1
1066	151.68	9.48	9.19	9.00	8.92	8.67	8.43	1.3580	9.2 16.6
1068	156.81	9.80	9.50	9.31	9.22	8.96	8.71	1.3587	9.5 17.1
1070	161.94	10.12	9.81	9.60	9.53	9.25	9.00	1.3595	9.7 17.5
1072	167.07	10.44	10.12	9.92	9.83	9.55	9.28	1.3602	10 18.0
1074	172.33	10.76	10.44	10.22	10.13	9.84	9.57	1.3610	10.2 18.4
1076	177.33	11.08	10.75	10.53	10.43	10.13	9.85	1.3617	10.5 18.9
1078	182.46	11.40	11.06	10.85	10.73	10.43	10.14	1.3625	10.7 19.3
1080	187.59	11.72	11.37	11.13	11.03	10.72	10.42	1.3632	11 19.8
1082	192.71	12.04	11.68	11.45	11.34	11.01	10.71	1.3640	11.2 20.2
1084	197.84	12.36	11.99	11.75	11.64	11.30	10.99	1.3647	11.5 20.7
1086	202.97	12.69	12.30	12.06	11.94	11.60	11.28	1.3655	11.7 21.1
1088	208.10	13.00	12.61	12.35	12.24	11.89	11.56	1.3662	12.0 21.6
1090	213.23	13.33	12.92	12.67	12.54	12.18	11.85	1.3670	12.2 22.0
1092	218.36	13.65	13.23	12.97	12.84	12.48	12.13	1.3677	12.5 22.5
1094	223.49	13.97	13.54	13.27	13.15	12.77	12.42	1.3684	12.7 22.9
1096	228.62	14.29	13.86	13.57	13.45	13.06	12.70	1.3692	12.9 23.3
1098	233.75	14.61	14.17	13.89	13.75	13.36	12.99	1.3699	13.2 23.8
1100	238.88	14.93	14.48	14.17	14.05	13.65	13.27	1.3707	13.4 24.2
1102	244.00	15.25	14.79	14.41	14.35	13.94	13.56	1.3714	13.6 24.7
1104	249.14	15.57	15.10	14.70	14.65	14.24	13.84	1.3722	13.9 25.1
1106	254.27	15.89	15.41	15.00	14.96	14.53	14.13	1.3729	14.1 25.5
1108	259.39	16.21	15.72	15.30	15.26	14.82	14.41	1.3737	14.4 26.0
1110	264.52	16.53	16.03	15.73	15.56	15.12	14.70	1.3744	14.6 26.4
1112	269.65	16.85	16.34	15.90	15.86	15.41	14.98	1.3752	14.8 26.8
1114	274.78	17.17	16.65	16.18	16.16	15.70	15.27	1.3759	15.1 27.3
1116	279.91	17.49	16.96	16.47	16.46	15.99	15.55	1.3767	15.3 27.7
1118	285.04	17.81	17.27	16.77	16.77	16.29	15.84	1.3774	15.5 28.1
1120	290.17	18.14	17.59	17.05	17.07	16.58	16.12	1.3782	15.7 28.5
1122				17.35				1.3786	16 28.9
1124				17.65				1.3794	16.2 29.3
1126				17.95				1.3801	16.5 29.8
1128				18.23				1.3808	16.7 30.2

M.V. Masse volumique en kg/m³

T.S. Teneur en sucres (fructose et glucose)

I.R. Indice de refraction